

**BINDUNG VON OUABAIN
AN SCHILDDRÜSENZELLEN IN VITRO**

Quantifizierung der Na^+/K^+ - ATPase von
Thyreozyten in Inside-out-Follikeln

MARKUS LEHNER

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554619_0090

Aus dem Zellbiologischen Institut der Universität München
kommissarischer Vorstand Prof. Dr. Volker Herzog

BINDUNG VON OUABAIN AN SCHILDDRÜSENZELLEN IN VITRO

Quantifizierung der Na^+/K^+ -ATPase von Thyreozyten in Inside-
out-Follikeln

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Markus Lehner

aus
München

Jahr

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. V. Herzog

Mitberichterstatter : Prof. Dr. G. Paumgartner
Prof. Dr. W. Lange

Dekan : Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 26.03.1987

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. V. Herzog für seine hilfreiche Unterstützung bei den Experimenten, seine zahlreichen Anregungen und seine freundliche Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Daneben möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Zellbiologie herzlich danken für die freundliche Aufnahme und die großzügige Hilfe, die mir dort gewährt wurde.

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

DNS	- Desoxyribonucleinsäure
DMSO	- Dimethylsulfoxid
IO-Follikel	- Inside-out-Follikel
MMK	- Michaelis-Menten-Konstante
$\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$	- Na^+ - und K^+ -abhängige Adenosintriphosphatase
PCA	- Perchlorsäure
SEM	- Standard error of the Mean
Z	- Zelle
^3H -Ouabain	- tritiummarkiertes Ouabain

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG.....	1
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	2
2.1.	Material.....	2
2.1.1.	Gewebe.....	2
2.1.2.	Materialien und Geräte.....	2
2.1.3.	Chemikalien.....	3
2.2.	Methoden.....	5
2.2.1.	Isolation von Follikelsegmenten.....	5
2.2.2.	Präparation von Inside-out-Follikeln.....	5
2.2.3.	Sauerstoffmessung.....	6
2.2.4.	DNS-Bestimmung (modifiziert nach BURTON (12)).	9
2.2.5.	Szintillationsmessung.....	11
2.2.6.	Auswertung der Szintillationsmessung.....	15
2.2.7.	Versuche zur unspezifischen Bindung.....	16
3.	ERGEBNISSE.....	17
3.1.	Sauerstoffmessung.....	17
3.2.	Bestimmung der Bindungskinetik.....	18
3.3.	Unspezifische Bindung.....	25
3.4.	Berechnung der ATP-Turnoverrate.....	25
4.	DISKUSSION.....	26
4.1.	Einleitung der Diskussion.....	26
4.2.	Kritische Betrachtung der angewandten Methoden.	26
4.2.1.	Follikelisolation und IO-Follikelsystem.....	27
4.2.2.	Sauerstoffmessung.....	28
4.2.3.	Bestimmung der Bindungskinetik.....	29
4.2.4.	Methoden zur Bestimmung der unspezifischen Bindung.....	33
4.3.	Die Na^+/K^+ -ATPase.....	39
4.3.1.	Morphologie.....	39
4.3.2.	Transportarten.....	40
4.3.3.	Bindungsstellen.....	41
4.3.4.	Modell des Bindungsablaufs.....	42

	Seite
4.3.5. Transportmechanismus.....	45
4.4. Diskussion des Bindungsmodells.....	47
4.5. Diskussion der Ergebnisse.....	49
4.5.1. Durchlässigkeit der tight junctions.....	49
4.5.2. Ergebnisse der Szintillationsmessung.....	50
4.5.3. Bedeutung der Messungen.....	51
4.5.4. Besprechung der Arbeiten anderer Autoren.....	52
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	58
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	59
7. BILDТАFEL.....	74

1. EINLEITUNG

Nachdem die Na^+/K^+ -ATPase seit über zwanzig Jahren aufgrund ihrer zentralen Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des intrazellulären Ionengleichgewichts Gegenstand der Forschung war, ist sie nun auch für Studien wichtig geworden, die sich mit der Zellpolarität von Epithelien befassen.

Die fast ausschließliche Lokalisation an der basolateralen Zellmembran (32) und ihre leichte Markierung mit radioaktivem Ouabain machen die Na^+/K^+ -ATPase zu einem geeigneten Untersuchungsobjekt der polaren Organisation der Zellmembran.

Aufgrund zahlreicher Arbeiten besitzen wir heute viele Kenntnisse über die Wechselwirkung des Ouabains mit der Na^+/K^+ -ATPase, seine Bindungskinetik, die Blockade des Ionentransports etc.. Die meisten dieser Erkenntnisse stammen allerdings aus Studien, die mit Membranpräparationen des Enzyms arbeiteten (26, 41), nur sehr wenige Untersuchungen wurden an lebenden Zellen durchgeführt (79).

Diese Lücke zu schließen ermöglichte nun das von HERZOG et al. (49) entwickelte Zellsystem des Inside-out-Follikels aus Schweineschilddrüsenepithel. Die besonderen Vorteile gegenüber anderen in-vitro-Zellsystemen, wie das Vorliegen in Reinkultur und die hohe Ausdifferenzierung der Zellen, ließen es sinnvoll erscheinen, nochmals eine Analyse der Bindungskinetik des Ouabains, sowie eine Quantifizierung der Na^+/K^+ -ATPase an Inside-out-Follikeln durchzuführen. Das Ziel dieser Arbeit war es, damit die Grundlagen für weitere Studien über die Zellpolarität anhand der Na^+/K^+ -ATPase von Thyreozyten zu schaffen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Gewebe

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Inside-out-Follikel dienten frische Schweineschilddrüsen von etwa 6 bis 8 Monate alten, im Schnitt ca. 90 kg schweren Schweinen. Die Drüsen wurden etwa 10 min nach Elektroanästhesie und Entblutung der Schweine, unmittelbar nach dem Brühen und Abflammen entnommen. Auf Eis gekühlt wurden sie dann innerhalb einer Stunde ins Labor transportiert und dort in den nächsten zwei Stunden verarbeitet.

2.1.2. Materialien und Geräte

Hydrophobe Kulturschalen: Petriperm, Heraeus, Hanau

Nylongaze: Fa. Franz Eckert AG, Seidengazefabrik Waldkirch,
Schweiz

Zentrifugen: Minifuge 2, Heraeus Christ, Osterode

Microfuge 152, Beckman Instruments, München

Photometer: Spektrophotometer 2400 Gilford Instruments,
Stuttgart

Liquid-Scintillation-Spectrometer: Tricarb 2450, Packard
Instruments, Frankfurt a.M.

2.1.3. Chemikalien

Tabelle 1: In den Versuch eingesetzte Chemikalien

Acetaldehyd: Merck, Darmstadt Art. 5

Amphotericin B (Fungizone Squibb): Flow Lab.(Bonn) Nr. 16-723-46

Collagenase aus Clostridium histolyt.: Boehringer (Mannheim)
Nr. 103 586

Dimethylarsinsäure Natriumsalz (Trihydr.): Merck Schuchardt
Art. 820 670

Diphenylamin: Serva Feinbiochemica (Heidelberg) Nr. 20563

Dimethylsulfoxid (DMSO): Merck Schuchardt ART. 802912

DNS aus Kalbsthymus: Sigma Chemie (München) Nr. D-1501

Essigsäure (96%): Merck Darmstadt Art. 62

Fetales Kälberserum: Gibco Biokult (Glasgow) Nr. 629 HI

Glutaraldehyd (70%): Ladd Research Ind. (Burlington, Vt.USA)

Insta-Floor TN: Packard (Frankfurt/Main) Nr. 6013027

Minimal Essential Medium: Boehringer (Mannheim) Nr. 209996

Paraformaldehyd: Merck, Darmstadt Art. 4005

Perchlorsäure (Suprapur): Merck, Darmstadt Art. 517

Ouabain: Sigma Chemie (St. Louis, USA) No. O-3125

Schwefelsäure (Suprapur): Merck, Darmstadt Art. 714

Soluene 350: Packard (Frankfurt/Main) Nr. 6003038

Streptomycin-Penicillin: Boehringer (Mannheim) Nr. 210404

Trypsin-Inhibitor: aus Sojabohnen: Sigma Chemie (München) Nr.T-9003

RADIOCHEMIKALIEN:

³H-Ouabain: Amersham-Buchler (Braunschweig) Nr. TRK 429
Batch 20,21

Folgende Lösungen fanden Verwendung:

Kulturmedium: Eagle's Minimal Essential Medium

- + 1 mg/ml Glucose
- + 0,1 mg/ml Trypsininhibitor
- + 100 IU/ml Penicillin
- + 100 µg/ml Streptomycin
- + 0,5 µg/ml Amphotericin B

Farbreagenz nach BURTON (12):

- 10 ml Essigsäure (96%)
- 200 mg Diphenylamin
- 200 µg Schwefelsäure (Suprapur)
- 50 µl Acetaldehyd (7,5 mM)

Aldehydfixans modifiziert nach KARNOVSKY (64):

Herstellung: 934 mg Paraformaldehyd werden mit 10 ml A.bidest auf ca. 70°C erhitzt. Dann wird NaOH (1N) bis zur Klärung zugegeben. Nach Hinzufügen von 46,7 ml Dimethylarsinsäurelösung (0,2 M) und 4 mg Glutaraldehyd (70%) wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, die Lösung mit A.bidest auf 93,4 ml aufgefüllt und filtriert.

Endkonzentrationen: 3% Glutaraldehyd

1% Formaldehyd

in 0,1 M Dimethylarsinsäurepuffer.

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation von Follikelsegmenten

Die Isolation fragmentierter Schilddrüsenfollikel erfolgte nach der Methode von HERZOG und MILLER (49) basierend auf dem Prinzip der Collagenase-Verdauung von Schilddrüsengewebe und Isolation von Follikelsegmenten durch Filtration und differentiellen Zentrifugation (siehe Abb. 1).

Hierzu wurde das Schilddrüsengewebe mit Rasierklingen in kleine, 1 - 2 mm große Gewebstücke geschnitten, wobei sichtbares Bindegewebe nach Möglichkeit entfernt wurde. Diese Stückchen wurden dann in Medium gewaschen und in einer Collagenase-Lösung (Endkonzentration 1 mg/ml) in einem Wasserschüttelbad mit 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die angedauten Gewebstückchen ca. 90 min lang durch Pasteurpipetten mit abgeflammter Spitze abnehmenden Durchmessers (von ca. 1000 µm bis 600 µm) gesaugt. Die genaue Dauer des Pipettivorgangs richtete sich dabei nach dem Widerstand der Gewebssuspension beim Hochsaugen.

Danach wurde die Suspension durch eine Nylon-Filtergaze mit 250 µm Netzweite filtriert, um größere Gewebsteile zurückzuhalten. Nach einer Zentrifugation bei 70 g für 30 sec wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert, nochmals durch 150 µm Gaze filtriert und erneut gewaschen (siehe Tab. 2).

2.2.2. Präparation von Inside-out-Follikeln

Prinzip: Schilddrüsenfollikelsegmente bilden in Suspensionskultur erneut vollständig geschlossene Follikel, allerdings mit umgekehrter polarer Organisation der Follikelzellen (49).

Anschließend an die Isolation von Follikelsegmenten nach obiger Methode wurde die Zellsuspension jetzt unter sterilen Kautelen sechsmal mit sterilem Medium gewaschen. Danach erfolgte die Aussaat der Follikelsegmente in hydrophoben Kulturschalen mit Medium, das mit 10% fetalem Kälberserum angereichert worden war. Über 20 Std wurden die Kulturschalen dann im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt unter 4% CO₂-Zugabe zur Stabilisierung des pH-Werts.

Unmittelbar vor Verwendung wurden die nunmehr geschlossenen 10-Follikel aus den Kulturschalen abgezogen und mit frischem Medium zweimal gewaschen, um Einzelzellen von den Follikeln zu trennen. In dieser Suspension wurden sie dann in den sich anschließenden Experimenten eingesetzt (siehe Tab.2).

2.2.3. Sauerstoffmessung

a) Prinzip:

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs der Follikelsegmente wurde mit Hilfe einer Silber-Platin-Elektrode nach CLARK (18) durchgeführt (48). Mit diesem Elektrodentyp wird die Änderung der Leitfähigkeit einer KCl-Lösung in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck der Flüssigkeit registriert. Das Meßsignal wird anschließend verstärkt und auf einen Schreiber geleitet. Eine semipermeable Teflonmembran zwischen der KCl-Lösung und dem eigentlichen Reaktionsmedium des Versuchs gewährleistet einen Ausgleich des Sauerstoffdrucks beider Flüssigkeiten (siehe Abb. 2).

Die Clarkelektrode befindet sich in einer abgeschlossenen Meßkammer aus Plexiglas von ca. 1 ml Volumen, die mit einem kleinen Seitenstutzen zur Zugabe von Reagenzien ausgestattet ist. Die Temperatur der Kammer wurde durch einen wasserdurchströmten Aluminiumblock konstant gehalten, während ein Rührer für eine gleichmäßige Durchmischung des Reaktionsmediums sorgt.

Abbildung 1: Isolation der IO-Follikel

Nach dem Kleinschneiden des Schilddrüsen-
gewebes (a) folgt eine 30minü-
tliche Inkubation in einer Collagenase-
lösung zur Abbaumung des Bindegewebes.
Anschließend wird die Follikelsuspension
durch Glaspipetten absteigenden
Durchmessers gesaugt um die Follikel
zu rupturieren. Nach mehrfacher Wa-
schung und Filtration durch Nylongaze
wurden die Follikelsegmente (b) in
hydrophoben Kulturschalen ausgesät,
wo sie sich bei 37°C in den nächsten
20 Stunden zu geschlossenen Inside-
out-Follikeln formieren (c).

Die so gewonnenen IO-Follikel haben
eine hohe mechanische Stabilität und
zeichnen sich gegenüber anderen
Zellsystemen durch die große Rein-
heit und den hohen Differenzierungs-
grad der Thyreozyten aus.



Tabelle 2: Gewinnung von Inside-out-Follikeln aus Schweine-schilddrüsen

Dauer	Präparationsschritt	Temp.	Medium	Arbeitsbedingungen
60 min	Entnahme der Drüsen Transport ins Labor	4°C	auf Eis	unsteril
90 min	Entfernen des Binde- gewebes, Kleinschneiden, Waschen der Stücke	4°C	Medium	
30 min	Enzymatische Verdauung des Bindegewebes	37°C	Medium Kollagenase	
90 min	Pipettieren	37°C		
30 min	Filtration und Waschen der Follikelfragmente	20°C	Medium	
30 min	sechsmaliges Waschen	20°C	Medium	steril
10 min	Aussaat	20°C	Medium + FKS	
20 Std	Inkubation im Brut- schrank mit 4% CO ₂	37°C		
15 min	Waschen der IO-Follikel	20°C	Medium	unsteril

b) Durchführung der Messung

Zunächst wurde die Elektrode mit der Teflonmembran bezogen, so daß der Spalt zwischen Folie und Elektrode mit 1 molarer KCl-Lösung gefüllt war, dann wurde sie in die Meßkammer eingeschraubt, an den Verstärker angeschlossen und für mindestens 60 min mit A.bidest auf Konstanz hin geprüft.

In dieser Zeit wurde die Zellsuspension und das Spülwasser im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Durch Begasen der Kammerflüssigkeit mit N₂ als Nullwert und 20% O₂ als Maximalwert wurde der Schreiber geeicht.

Etwa 500 µl der Zellsuspension wurde nun in die Meßkammer eingesetzt, diese mit Medium aufgefüllt und verschlossen. Nach Einschalten des Magnetrührers wurde für ca. 10 min der Ruheverbrauch der Zellsuspension registriert. Danach wurde durch den kurzfristig geöffneten Seitenstutzen 10 µl hochkonzentrierter Ouabainlösung (Lösungsvermittler DMSO, Endkonzentration ca. 0,1 mM) zugegeben und der weitere Sauerstoffverbrauch nochmals für mindestens 10 min aufgezeichnet. Nach Ende der Messung wurde die Zellsuspension abgesaugt und zur DNS-Bestimmung aufbewahrt. Eine mehrfache Spülung mit temperiertem A.bidest machte die Kammer für weitere Messungen einsatzbereit.

2.2.4. DNS-Bestimmung (modifiziert nach BURTON (12))

Die jeweilige Zellprobe wurde mit 1 ml 0,5 M PCA aufgeschlossen und die DNS während 60 min im Eisbad zur Präzipitation gebracht. Danach wurde der Überstand abgegossen und die Probe mit 1 ml frischer PCA für 20 min im Wasserbad bei 75°C hydrolysiert. Der dabei entstandene Überstand wurde für die Farbreaktion verwendet, wobei manchmal Proben zur Lagerung eingefroren wurden.

Eine Verdünnungsreihe von in PCA hydrolysierte DNS wurde angelegt und als jeweilige Eichprobe zum Versuch verwendet. Mit frisch angesetzttem Farbandsatz nach BURTON wurden die Proben bei 22°C für mindestens 20 Std. (bis zu 48 Std) inkubiert. Die Messung der Extinktion der Proben fand an einem Spektralphotometer bei 596 nm statt. Mit Hilfe der aus den Eichproben erstellten Eichkurven wurde der DNS-Gehalt der verschiedenen Proben errechnet. Da der DNS-Gehalt von Thyrozyten im Schnitt ca. 5 µg DNS/Zelle beträgt, wurden die Ergebnisse mit Hilfe dieses Umrechnungsfaktors auf 10^6 Zellen bezogen.

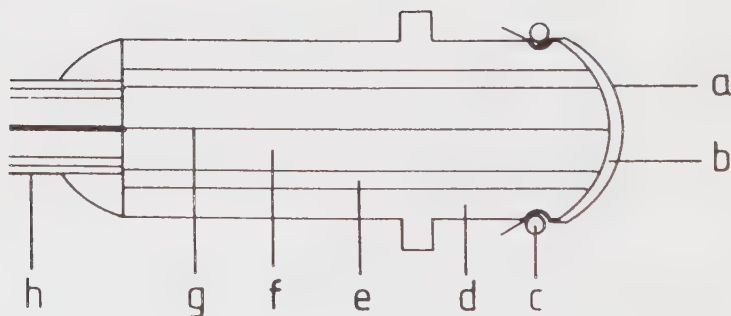


Abbildung 2: Aufbau der O₂-Elektrode

a- semipermeable Teflonmembran, b- mit KCl-Lösung gefüllter Spalt, c- Dichtungsring, d- Kunststoffmantel, e- ringförmige Silberanode, f- Glasisolierung, g- Platinkathode, h- Anschlußstück; der Durchmesser der Elektrode beträgt ca. 6 mm.

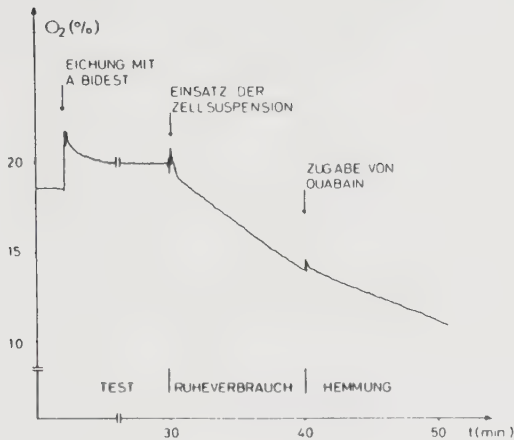


Abbildung 3: Ablauf einer O_2 -Messung

Nach der Prüfung der Elektrodenstabilität mit A.bidest. sowie der Eichung des Schreibers durch Begasen der Meßkammer mit 20% O_2 wurde die Zellsuspension zugegeben und der O_2 -Verbrauch der IO-Follikel registriert. Etwa 10 min später wurde über den seitlichen Einfüllstutzen hochkonzentriertes Ouabain zugesetzt und der O_2 -Verbrauch über weitere 10 min gemessen. Dessen Reduzierung durch die Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase errechnet sich aus den Steigungen der beiden Meßabschnitte.

2.2.5. Szintillationsmessung

a) Prinzip

Folgender Ablauf bildete das Grundschemata der Versuche mit liquid scintillation count:

1. Ein Gemisch aus 3H -Ouabainlösung, 1% DMSO (als Lösungsvermittler) und Medium wurde im Eisbad zur Austreibung des Äthanols für ca. 20 min mit N_2 begast um Zellschäden durch den Alkohol zu vermeiden.

2. Mit einer Verdünnungsreihe wurden Lösungen mit verschiedenen ^3H -Ouabaingehalten hergestellt und mit den 10-Follikeln, die kurz zuvor aus den Kulturschalen gewonnen worden waren, im Brutschrank bei 37°C mit CO_2 -Zusatz inkubiert.
3. Nach der Inkubation wurden die Zellproben innerhalb von 10 min mehrfach, meist viermal mit Medium gewaschen um überschüssiges ^3H -Ouabain zu entfernen.
4. Nun wurden die Proben zur DNS-Bestimmung nach BURTON mit Präzipitation im Eisbad und Hydrolysatation bei 75°C aufgearbeitet. Dabei wurden 100 μl aus dem Präzipitationsüberstand und dem Hydrolysatationsüberstand zur Szintillationsmessung abgezweigt, ebenso das nach der Hydrolysatation verbleibende Pellet. 400 μl des Hydrolysatationsüberstands wurde zur DNS-Messung am Photometer verwendet.
5. Die Szintillationsproben wurden in Zählgläsern mit 1 ml Soluene versetzt, bei 50°C 60 min im Brutschrank inkubiert um evt. Gewebereste zu verdauen. Nach Zugabe von 10 ml Insta-Fluor und einigen Stunden Wartezeit zum Abklingen der Chemolumineszenz wurden die Proben im Liquid Scintillation Spectrometer gemessen und am Computer mit Hilfe des ESCR (External Standard Channel Ratio) ausgewertet (siehe Tab. 3).

b) Modifikationen

SERIE 1: Diese erste Versuchsreihe diente zur Installierung der Versuchsanordnung. Im Gegensatz zu den nachfolgenden Serien wurden frisch isolierte Follikel-segmente verwendet. Es wurde eine kontrollierte zehnfache Waschung der Zellproben nach der Inkubation durchgeführt. Zwei Versuche liefen mit zwei ^3H -Ouabainkonzentrationen bei einer Inkubationszeit und ein Versuch mit mehreren Entnahmezeiten. Als Reaktionsgefäße wurden Glaswaren verwendet.

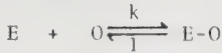
- SERIE 2: Ab der zweiten Serie wurde mit ca. 20 Std alten IO-Follikeln gearbeitet. Die Qualität der Waschung wurde im 1. Versuch mit einer kontrollierten achtfachen Waschung dokumentiert, in allen weiteren Versuchsserien wurde daraufhin viermal gewaschen. Bei den Experimenten wurden mehrere Konzentrationen bei meist zwei Inkubationszeiten untersucht. Ab dieser Versuchsserie wurde auch zur Arbeitsvereinfachung von Glaswaren auf 1,5 ml Nethlerbecher als Reaktionsgefäße umgestellt. Dabei wurden die Waschungen durch kurzes Anzentrifugieren in einer Microfuge ausgeführt.
- SERIE 3: In der dritten Serie wurden Großversuche mit bis zu acht verschiedenen Konzentrationen und Entnahmepunkten durchgeführt. Am Ende der Inkubation wurde die Bindungsreaktion durch Zugabe von hochkonzentriertem kaltem Ouabain (Endkonzentration ca 2 mM) gestoppt. Aus technischen Gründen mußte die Präzipitationszeit im Eisbad auf 24 Std ausgedehnt werden. Da die Radioaktivität der Zellpellets sich in diesen Versuchen kaum noch von der Nullprobe unterschied, wurde auf eine weitere Messung der Pelletprobe verzichtet.
- SERIE 4: Die Durchführung erfolgte ebenso wie Serie 3 mit meist sechs Konzentrationen und Inkubationszeiten. Allerdings wurden etwa zwei Drittel der präparierten Follikelmenge entsprechend den Versuchsanordnungen zur Bestimmung der unspezifischen Bindung behandelt. Die weitere Bearbeitung dieser Proben erfolgte dann gleichzeitig mit den anderen, unbehandelten Follikeln.

Tabelle 3: Schema zum Ablauf der Szintillationsmessung

Dauer	Ablauf	
30 min	Herstellung einer ^3H -Ouabainlösung, Entfernung des Äthanol Anlegen einer Verdünnungsreihe	Vorbereitung
20 - 300 min	Inkubation der IO-Follikel in ^3H -Ouabain bei 37°C	
10 min	Zugabe von kaltem Ouabain, viemaliges Waschen	
60 min oder 24 Std	Präzipitation der Proben-DNS im Eisbad 100 μm Überstand zur Szintilla- tionsmessung	DNS-Bestimmung nach BURTON
20 min	Hydrolysatation der Probenpellets bei 75°C 100 μm Überstand zur Szintilla- tionsmessung 400 μm Überstand zur Farbreaktion und DNS-Bestimmung	Bestimmung der Probenradioaktivität
80 min	Versetzung der Überstandsproben mit Soluene, Inkubation bei 50°C Zugabe von Insta-Fluor	
5 Std	Abklingphase der Chemolumines- zenz	
4 Std	Messung der Proben im Liquid- Scintillation-Counter	

2.2.6. Auswertung der Szintillationsmessung

Der Auswertung der in den Szintillationsmessungen registrierten Kurven lag folgendes Bindungsmodell zugrunde (104) (über die Gültigkeit des Modells siehe 4.4.)



(k = Assoziationskonst. l = Dissoziationskonst., E = freies Enzym, $E-O$ = Enzym-Ouabain-Komplex, O = freies Ouabain)

Unter der Voraussetzung, daß der an das Enzym gebundene Anteil vernachlässigbar klein gegenüber der Gesamtkonzentration des Ouabains C_0 ist und so C_0 = konstant gesetzt werden kann, leitet sich folgende Bindungsfunktion daraus ab:

$$E-O(t) = E_{\text{tot}} \cdot C_0 \cdot k / (kC_0 + l) \cdot (1 - e^{-(kC_0 + l)t})$$

(E_{tot} = Gesamtmenge des Enzyms, t = Reaktionszeit)

Anhand eines computergestützten numerischen Verfahrens erfolgte eine Anpassung dieser Bindungsfunktion an die gemessene Kurvenschar.

Die sonst übliche Prüfgröße der "Summe der Fehlerquadrate" (104) fand hier keine Anwendung, da aufgrund der Versuchsanordnung die Meßfehler von der Größe der Meßwerte abhängig waren. Deshalb wurde der durchschnittliche relative Fehler* als Maß der Abweichung gewählt. Diese Prüfgröße scheint der Problemstellung am besten gerecht zu werden.

$$* \quad \frac{1}{n} \sum \frac{a_i - x_i}{a_i}$$

2.2.7. Versuche zur unspezifischen Bindung

a) Vorinkubation mit kaltem Ouabain (79, 76)

Diese Versuche wurden nach dem Schema der Serien 2 und 3 durchgeführt. Nach Präparation der Follikel aus den Kulturschalen wurden diese für 30 min in einer Mischung aus Medium, 1% DMSO und nichtmarkiertem Ouabain (Endkonzentration 2 mM) inkubiert. Nach mehrfachen Waschungen zur Entfernung des überschüssigen Ouabains erfolgte die Inkubation mit ^3H -Ouabain gemäß der entsprechenden Versuchsserie.

b) Verwendung eines Na-freien Inkubationsmediums (79)

Unter mehrfachen Wechsel der Flüssigkeit wurden die 10-Follikel insgesamt 60 min in Na-freiem Cholinmedium inkubiert. Die zur weiteren Inkubation mit ^3H -Ouabain notwendige Verdünnungsreihe wurde ebenfalls mit Cholinmedium angelegt. Danach wurden die Follikel entsprechend dem Versuchsplan der Serie 4 weiterbehandelt.

c) Aldehydfixation modifiziert nach KARNOVSKY (64)

Vor der Inkubation in ^3H -Ouabain wurden die 10-Follikel für 10 min mit Aldehydfixans nach KARNOVSKY fixiert. Anschließend wurde eine mehrfache Spülung mit Medium durchgeführt und die Follikel mit den restlichen Zellen der Serie 4 weiterverarbeitet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Sauerstoffmessung

Die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von Thyreozyten in Inside-out-Follikeln unter dem Einfluß von Ouabain sollte die freie Zugänglichkeit der Na^+/K^+ -ATPase für Ouabain belegen und die Existenz eines größeren Diffusionshindernisses ausschließen. Vor Zugabe des Ouabains wurde ein O_2 -Verbrauch der 10-Follikel von durchschnittlich $0,49 \text{ nmol O}_2/(\text{min } 10^6 \text{ Zellen})$ gemessen. Nach der Zugabe verminderte sich dieser Verbrauch im Mittel um 39%. Die Reduktion des O_2 -Verbrauchs war mit dem Ende der Durchmischungsphase von ca. 10 - 15 sec Dauer abgeschlossen, der anschließende Sauerstoffverbrauch der Zellen blieb dann über den Rest der Versuchszeit konstant, sofern nicht ein Mindestsauerstoffgehalt der Inkubationslösung von ca. 10% unterschritten wurde (siehe Tab. 4).

Tabelle 4: Ergebnisse der O_2 -Messung

	O_2 -Verbrauch	Hemmung nach Ouabainzugabe
Anzahl der Messungen	7	16
Mittelwert	$0,49 \text{ nmol O}_2/(\text{min} \cdot 10^6 \text{ Z})$	39%
Standardabw.	0,09	8,5
Spannweite	0,41 - 0,62	25 - 53

3.2. Bestimmung der Bindungskinetik

a) Versuchsserie 1

Diese Experimente wurden mit frischen Follikelsegmenten unmittelbar nach der Isolation durchgeführt zur Testung der Versuchsanordnung. Dabei konnte die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Ouabainbindung an die Na^+/K^+ -Pumpe nachgewiesen, sowie die grundsätzliche Eignung des Versuchsaufbaus bestätigt werden.

Der Verlauf der mit den Follikelsegmenten durchgeführten kontrollierten Waschungen zeigte jedoch, daß auch nach zehn Waschvorgängen noch eine erhebliche Menge Radioaktivität ausgewaschen wurde. Offenbar gelangten während der einzelnen Zentrifugationen markierte Einzelzellen oder Membranfragmente in den Überstand. Frische Follikelsegmente erwiesen sich damit als zu instabil für dieses Experiment. Eine ungefähre Größenordnung für die Anzahl der Bindungsstellen konnte dennoch mit $1 - 5 \text{ pmol}/10^6$ Zellen gewonnen werden und diente als Richtlinie für die weiteren Versuche.

b) Serie 2

Diese Versuche wurden mit 10-Follikeln durchgeführt, ca. 20 Stunden nach Isolation. Die Ergebnisse der kontrollierten Waschungen zeigten, daß bereits nach drei Waschungen die Radioaktivität im Überstand weniger als 1% der Probe betrug (siehe Abb. 4). In den folgenden Experimenten wurden die Follikel daraufhin viermal gewaschen.

Da aus jeder Zellpräparation nur wenige Meßpunkte bestimmt wurden, mußten die Resultate mehrerer Versuche für die Auswertung herangezogen werden. Die starken Schwankungen zwischen den einzelnen Präparationen führte zu einer sehr inhomogenen Punktschar, die numerische Anpassung der Bindungsfunktion mit Hilfe eines Computers war dennoch möglich (siehe Tab. 5 und Abb. 5).

c) Serie 3

Um eine Störung der Auswertung durch unterschiedliche Präparationen zu vermeiden, wurden die IO-Follikel nun in Großversuchen mit bis zu acht Ouabainkonzentrationen und Inkubationszeiten untersucht. Damit wurde eine Parameterbestimmung aus einer einzigen Präparation ermöglicht. Da die Zellmenge für derart viele Einzelmessungen sehr gering war, mußte auf Doppelbestimmungen verzichtet werden. Manche Meßwerte wurden deshalb als offensichtliche Fehlbestimmungen nicht zur Auswertung herangezogen (siehe Tab. 5 und Abb. 6).

d) Serie 4

Um auch bei der unspezifischen Bindung einen direkten Vergleich mit Follikeln derselben Präparation zu ermöglichen, wurde, unter Beibehaltung des Schemas von Serie 3, die Zellmenge geteilt und ein Teil entsprechend dem jeweiligen Versuch zur unspezifischen Bindung vorbehandelt. Aufgrund der dabei gebundenen minimalen Mengen von Radioaktivität mußte die Zellmenge zur Untersuchung der spezifischen Bindung noch weiter reduziert werden. Da hier mehrere Versuche bei gleichen Ouabainkonzentrationen und Inkubationszeiten durchgeführt worden waren, konnte hier für viele Meßpunkte ein Mittelwert über verschiedene Präparationen gebildet werden. Die iterative Parameterbestimmung wurde aus diesen Mittelwertkurven durchgeführt. Die bei den höchsten Ouabainkonzentrationen aufgetretene Verringerung der Ouabainbindung nach Überschreitung eines Maximums wurde auch von SILVA et al. (105) in ihren Experimenten beobachtet.

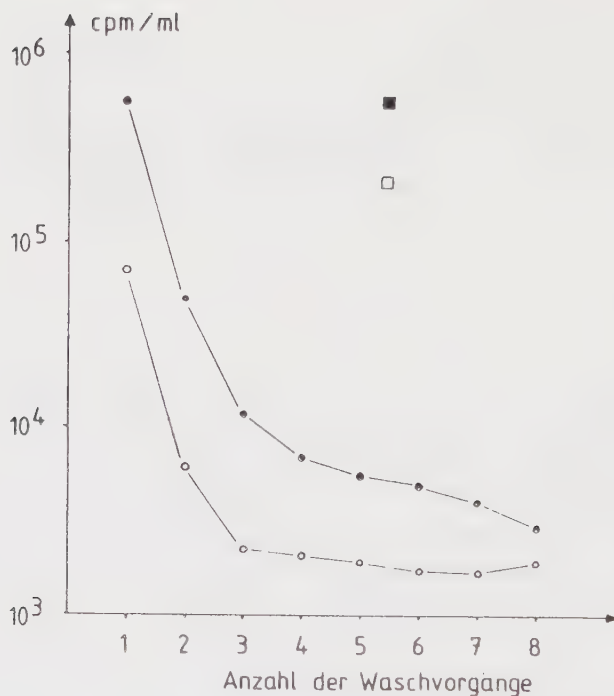


Abbildung 4: Kontrollierte Waschung der Versuchsserie 2

Nach Beendigung der Inkubation in ^3H -Ouabain (Konz. 0,23 μM (O) und 2,56 μM (●)) wurden die Zellproben mehrfach in 1 ml Medium gewaschen und die Radioaktivität im Überstand gemessen. □ und ■ geben die Radioaktivität der Zellproben an, $n = 4$

Alle weiteren Experimente wurden mit vier Waschvorgängen durchgeführt, da die darüberhinaus noch auswaschbare Menge an ^3H -Ouabain weniger als 1% der Probenradioaktivität betrug. Man beachte den logarithmischen Maßstab.

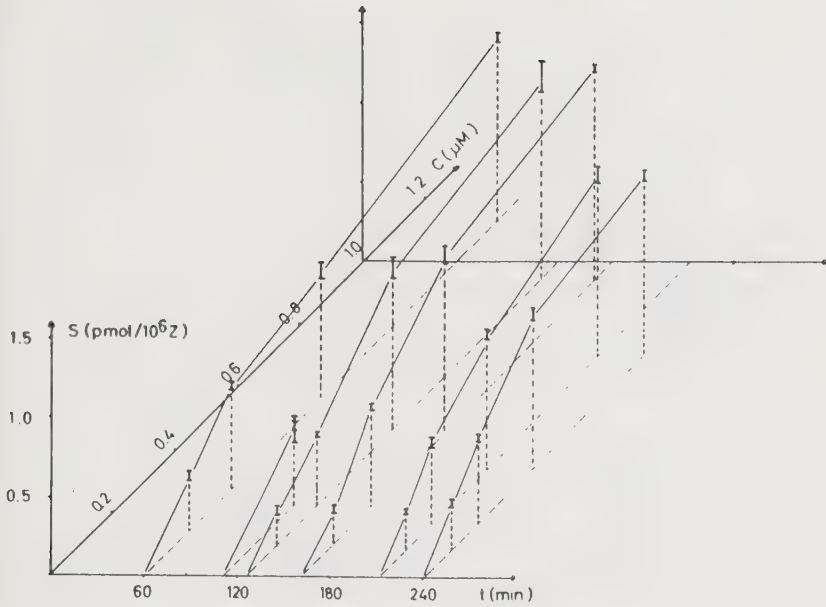


Abbildung 5: Ergebnisse der Versuchsserie 2: Abhängigkeit der Ouabainbindung an IO-Follikel von der Inkubationszeit und der Ouabainkonzentration. Jeder Balken repräsentiert eine Doppelbestimmung. Proben derselben Präparation sind durch horizontale, gestrichelte Linien verbunden. Die Verwendung unterschiedlicher Ouabainkonzentrationen machte eine dreidimensionale Darstellung erforderlich.

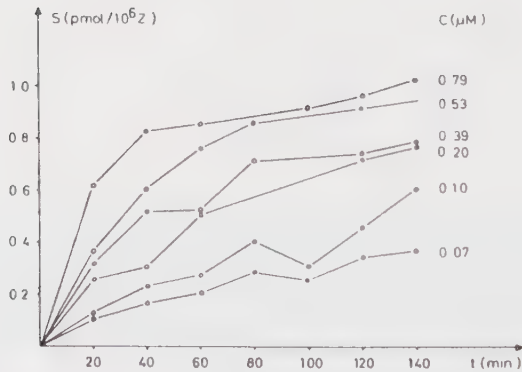
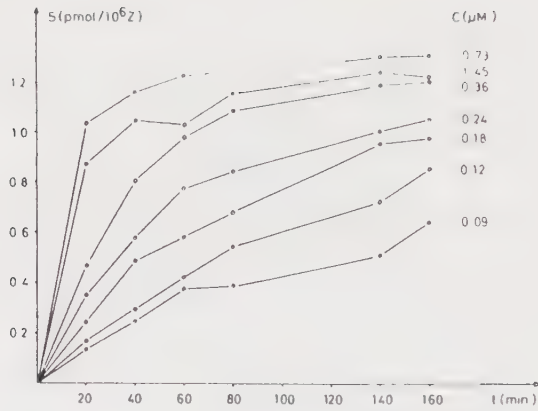


Abbildung 6: Abhängigkeit der Ouabainbindung an 10-Follikel von der Inkubationszeit bei verschiedenen Konzentrationen von ^3H -Ouabain. Die Bindung S ist angegeben in pmol pro 10^6 Zellen. Jeder Punkt entspricht einer Einzelmessung. Die Abbildungen a und b zeigen die Ergebnisse zweier Präparationen der Versuchsserie 3.

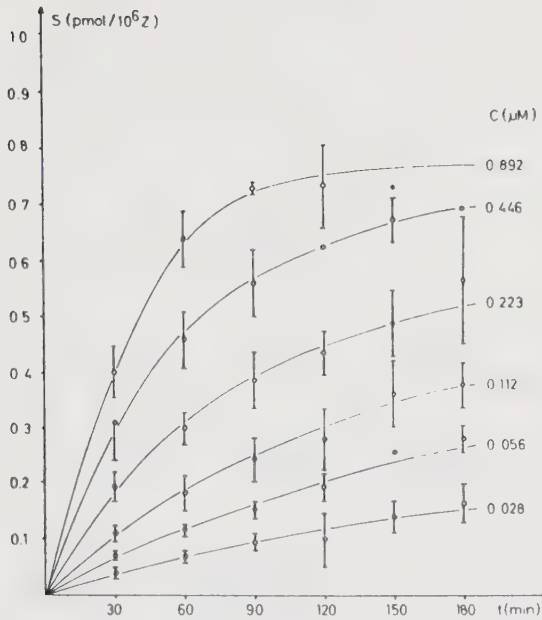


Abbildung 7: Bindung von ^3H -Ouabain an IO-Follikel in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Konzentration, Ergebnisse der Versuchsserie 4.

Aufgetragen sind die Mittelwerte $\pm 2 \text{ SEM}$ aus 2 - 5 Messungen von verschiedenen Präparationen. Punkte ohne Angabe des SEM entsprechen Einzelmessungen.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse

Versuch	Anzahl d. Meßpunkte	Bindungsstellen pmol/10 ⁶ Z	Assoziationskonstante k l/(min·µM)	Dissociationskonstante 1 1/min	Michaelis-Menten-Konstante M	mittlerer rel. Fehler
Serie 2	48	1,78	4,01·10 ⁻²	1,63·10 ⁻²	4,05·10 ⁻⁷	13,7 %
Serie 3a	44	1,22	6,47·10 ⁻²	2,03·10 ⁻³	3,13·10 ⁻⁸	5,5 %
Serie 3b	55	0,91	7,85·10 ⁻²	1,09·10 ⁻³	1,39·10 ⁻⁸	11,0 %
Serie 4	36	0,69	5,27·10 ⁻²	8,30·10 ⁻⁴	1,58·10 ⁻⁸	9,7 %
Zusammenfassung: gewichtete Mittelung, orientiert an der Rangfolge der relativen Fehler						
	1,02		6,3·10 ⁻²	1,5·10 ⁻³	2,3·10 ⁻⁸	

Anzahl der Ouabainbindungsstellen in anderen Einheiten:

6,1·10⁵/Zelle
 1230/µm bei 500 µm basolateraler Membran pro Zelle
 1 pmol/mg wet wt bei 10⁶Zellen = ca. 1 mg

3.3. Unspezifische Bindung

Je nach Versuchsaufbau zeigten sich hier sehr unterschiedliche Ergebnisse. Aufgrund der großen methodischen Schwierigkeiten wurde darauf verzichtet, die Meßwerte der spezifischen Bindung damit zu korrigieren. Eine nähere Besprechung der Problematik erfolgt in der Diskussion der Methoden 4.2.4..

3.4. Berechnung der ATP-Turnoverrate

Die vor der Quantifizierung der Na^+/K^+ -ATPase durchgeführten Messungen der O_2 -Verbrauchshemmung unter dem Einfluß von Ouabain ermöglichen neben dem Nachweis der Zugänglichkeit eine Berechnung der ATP-Turnoverrate der Na^+/K^+ -Pumpe.

Der gemessene O_2 -Verbrauch von IO-Follikeln betrug ungefähr $490 \text{ pmol O}_2/(\text{min} \cdot 10^6 \text{ Z})$ und die Hemmung nach Ouabainzugabe im Mittel 39%, woraus sich ein O_2 -Verbrauch der ATPase von $190 \text{ pmol O}_2/(\text{min} \cdot 10^6 \text{ Z})$ ergibt. Bei einer Gesamtzahl von ca. $1 \text{ pmol}/10^6 \text{ Z}$ ATPasemolekülen errechnet sich ein O_2 -Verbrauch pro Pumpe von 190 Molekülen/min oder 1100 Molekülen ATP/min.

Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit Resultaten an anderen Geweben überein (Meerschweinchen-Colon 1320/min (11)), die zum Teil mit aufwendigen Verfahren wie der Aufnahme von ^{42}K erzielt wurden. Die hier angewandte Methode stellt damit eine bequeme Alternative für die Berechnung der Turnoverrate der Na^+/K^+ -ATPase dar.

4. DISKUSSION

4.1. Einleitung der Diskussion

Die Verwendung von radioaktivem Ouabain zur quantitativen Erfassung der Na^+/K^+ -ATPase und zum Studium der Bindungskinetik ist eine schon seit Jahrzehnten in vielen Laboratorien praktizierte Methode. Die Durchführung dieser Experimente an Enzympräparationen oder Gewebeschnitten ließ jedoch eine Übertragung der Ergebnisse auf physiologische Verhältnisse nur begrenzt zu.

Eine wesentlich bessere Vergleichbarkeit bietet das in dieser Arbeit benutzte Zellsystem der IO-Follikel aufgrund des Vorliegens der Zellen in Reinkultur, frei von Fibroblasten und Endothelzellen, sowie des hohen Differenzierungsgrades der Thyreozyten.

Die erzielten Ergebnisse zur Bindungskinetik von Ouabain an der Na^+/K^+ -ATPase bilden damit eine wichtige Grundlage für weitere Forschungen an der Na^+/K^+ -Pumpe im Schilddrüsenepithel.

4.2. Kritische Betrachtung der angewandten Methoden

Die erstmalige Verwendung von IO-Follikeln für Bindungsstudien und die dabei aufgetretenen Schwierigkeiten lassen eine gründlichere Besprechung der Methoden gerechtfertigt erscheinen, um eine bessere Einschätzung der Ergebnisse, besonders im Vergleich mit anderen Versuchen in der Literatur, zu ermöglichen.

4.2.1. Follikelisolation und IO-Follikelsystem

Die hier benutzte Methode der Follikelisolation wurde von V. HERZOG und F. MILLER (49) am Institut für Zellbiologie/München zur Gewinnung eines stabilen in vitro-Systems entwickelt.

Eine Voraussetzung für die Isolierung der Thyreozyten aus dem Gewebeverband ist die Anwendung von Collagenase zur Abdaunung des Bindegewebes und der nachfolgenden Einwirkung von Scherkräften zur Ablösung und Fragmentierung der Follikel. Eine Schädigung der Na^+/K^+ -ATPase durch diese Methode kann nicht ausgeschlossen werden. Es ist jedoch der derzeit einzige Weg, Thyreozyten in Reinkultur zu gewinnen.

Um die Ausbeute an Follikelsegmenten zu optimieren, ist eine individuelle Handhabung des Pipettiervorgangs und damit auch der Inkubationszeit in der Collagenaselösung erforderlich. Die Dauer des Pipettiervorgangs schwankte dabei zwischen 60 und 120 min. Die unterschiedliche mechanische und enzymatische Belastung der Zellen könnte somit unter anderem Unterschiede in den Ergebnissen der verschiedenen Experimente erklären.

In der anschließenden Ruhephase in hydrophoben Kulturschalen werden diese Zellschäden weitgehend ausgeglichen, die Follikelsegmente invertieren und schließen sich zu einem stabilen Zellverband, der einige Wochen am Leben erhalten werden kann (49).

Bei den Isolationen zur letzten Versuchsserie zeigten sich nach 20stündiger Kultur Qualitätseinbußen, die wir auf eine aggressivere Collagenasepräparation zurückführen. Neben einer geringeren Ausbeute an Follikelsegmenten fanden sich vermehrt Einzelzellen, die sich an der Oberfläche der IO-Follikel anlagerten, sowie eine starke Aggregationstendenz der Follikel selbst. Die deutlich geringere Anzahl von

Bindungsstellen in den darauffolgenden Messungen belegt die Bedeutung einer guten Strukturhaltung der Follikel für die Durchführung der Experimente.

Trotz dieser Schwierigkeiten sind IO-Follikel anderen Zellsystemen in mehrfacher Hinsicht überlegen. Zum einen stellen sie ein homogenes System aus einem einzigen Zelltyp dar, der nicht durch Bindegewebe oder Endothelzellen verunreinigt ist, zum anderen entspricht die Organisation des Follikels - abgesehen von der Orientierung der apikalen Membran nach außen - der eines nativen Schilddrüsenfollikels. Ferner belegt die geringe Zahl von Mitosen (102) eine sehr gute Ausdifferenzierung der Thyreozyten. Dies ist für die quantitative Bestimmung der Na^+/K^+ -ATPase wichtig, da mitotisch aktive Zellen kaum Ouabain binden (32). Insgesamt stellt der IO-Follikel die derzeit beste Annäherung eines in vitro-Systems an die physiologischen Gegebenheiten des Thyroidepithels dar.

4.2.2. Sauerstoffmessung

Die in dieser Arbeit verwendeten Werte wurden alle mit einer in früheren Studien des Instituts für Zellbiologie erprobten Versuchseinrichtung gemessen (48). Wegen des sehr hohen Zellbedarfs und der geringen Genauigkeit wurde daneben der Versuch unternommen, eine Meßanordnung mit wesentlich gesteigerter Auflösung zu entwickeln. Folgende Änderungen wurden dabei durchgeführt.

1. Die Kammer wurde mit zwei Elektroden versehen, die unabhängig voneinander den O_2 -Gehalt der Lösung registrieren, wodurch eine Kontrollmöglichkeit für die Elektroden geschaffen wurde. Meßfehler aufgrund defekter Elektroden konnten somit ausgeschaltet werden.

2. Die Wärmeisolation der Kammer wurde verbessert, und durch eine Verringerung des Plexiglasanteils der Wärmeaustausch zwischen Heizflüssigkeit und Kammer erleichtert. Damit konnte der starke Einfluß von Temperaturschwankungen in der Umgebung und von Temperaturdifferenzen zwischen Kammer und eingesetzter Zellsuspension deutlich verringert werden.
3. Der Magnetrührkern wurde durch einen mechanischen Rührer ersetzt, da bei gesteigerter Auflösung das starke Magnetfeld des Rührers die Elektroden massiv störte. Der während des Rührvorgangs erhöhte Wanddruck täuschte daneben bei beiden Rührerarten einen Anstieg des O_2 -Gehalts der Lösung um mehrere Prozent vor.

Mit diesen Änderungen konnte die Genauigkeit gegenüber der alten Versuchseinrichtung wesentlich gesteigert werden, obwohl das Ziel einer Darstellung eines Verbrauchs von 1 nmol O_2 /min mit einem maximalen Fehler von 10% nicht erreicht werden konnte. Die Genauigkeit der Messungen war jedoch völlig ausreichend, um die rasche und vollständige Blockierung der Na^+/K^+ -Pumpe durch Ouabain, und damit die Durchlässigkeit der tight junctions zu demonstrieren. Der gemessene absolute Sauerstoffverbrauch der Thyreozyten hingegen ist wohl nur als ungefähre Größenordnung zu werten.

4.2.3. Bestimmung der Bindungskinetik

Folgende Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung spielen eine wesentliche Rolle:

a) Beendigung der Inkubation

Während der Beginn der Inkubation durch die Zugabe der Ouabainlösung gut definiert ist, ist das Ende der Inkubation nicht genau festlegbar (siehe Abb. 9).

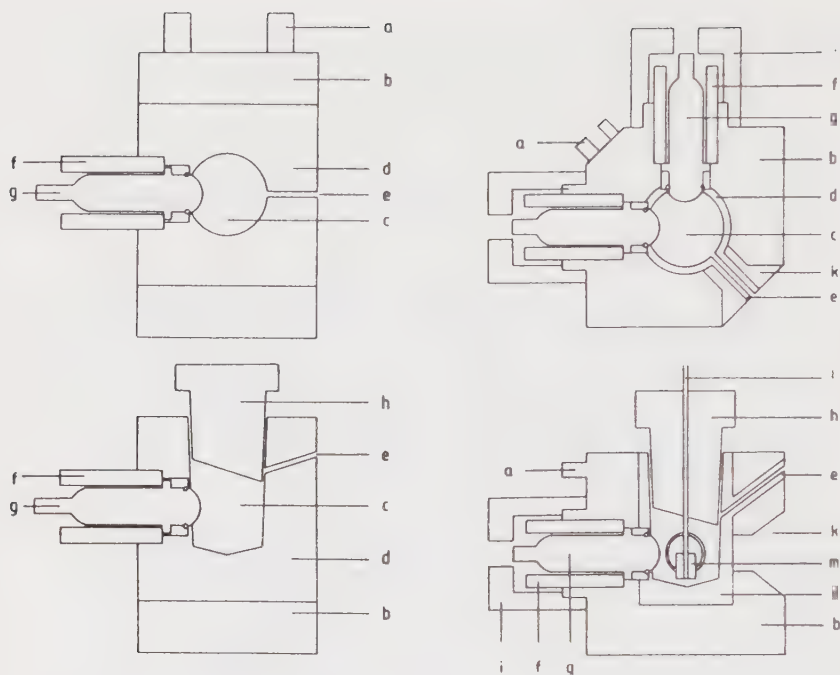


Abbildung 8: Aufbau der O_2 -Messkammern

a) alte Meßkammer, die zur Bestimmung des O_2 Verbrauchs der IO-Follikel verwendet wurde.

b) weiterentwickelte Meßkammer mit erhöhter Genauigkeit.

a - Anschlußstutzen für Wasserbadheizung, b - Aluminiumblock zur Temperierung der Kammer, c - Meßkammer, d - Plexiglasblock, e - kleiner Einfüllstutzen, f - Elektrodenhalterung, g - O_2 -Elektrode, h - Stopfen, i - Überwurfmutter aus Aluminium zur Temperierung der Elektroden, k - Sichtfenster, l - Rührerwelle, m - Rührer

Die Erhöhung der Meßgenauigkeit wurde erreicht durch eine Verkleinerung des Kammervolumens, eine verbesserte Wärmeisolation von Kammer und Elektroden, die Verwendung eines mechanischen Rührers, sowie den Einbau einer zweiten Elektrode.

Der vierfache Waschvorgang nahm bis zu 10 min in Anspruch. Wenn man annimmt, daß nach spätestens zwei Waschungen die Sättigung der Na^+/K^+ -ATPase nicht weiter zunimmt, und danach die Dissoziation überwiegt, kann die wahre Inkubationszeit nicht größer als die gewünschte $t_i + 5$ min sein. Als frühester Zeitpunkt für eine Abnahme der Sättigung kommt nur der Beginn der ersten Zentrifugation in Frage, ca. 1 min nach Ende der Inkubation t_i . Es bleibt also eine Unsicherheit in der Angabe der Inkubationszeit von ca. 4 min.

Um diesen Meßfehler zu reduzieren, wurde bei den Großversuchen der Serie 3 und 4 die Bindungsreaktion durch Zugabe von hochkonzentriertem kaltem Ouabain kurz vor der Waschung gestoppt. Dabei wird nicht die Bindungsreaktion an sich unterbrochen, aber es überwiegt das kalte Ouabain derart, daß eine weitere Assoziation auf weniger als ein Promille reduziert wird und damit vernachlässigt werden kann. Das heißt: Von der Zugabe des kalten Ouabains an fällt nur noch die Dissoziation bis zum Ende des Waschvorgangs ins Gewicht.

Da die Dissoziation nach einer Reaktion 1. Ordnung abläuft, und somit nur von der Zeit und der Dissoziationskonstanten abhängt, weichen sämtliche Meßwerte um den gleichen Prozentsatz vom realen Sättigungsgrad ab. Die Zahl der Bindungsstellen wird damit etwas zu niedrig geschätzt. Nach Auswertung der Kurven kann man zurückrechnen und als Maximalwert für die Rezeptorzahl $E + 1,5\%$ bei $l = 1,47 \cdot 10^{-3} / \text{min}$ angeben.

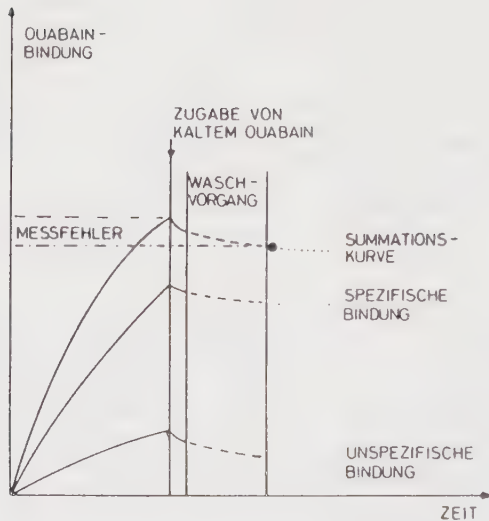


Abbildung 9: Schema des Verlaufs der Ouabainbindung an die Na⁺/K⁺-ATPase

Die gemessene Radioaktivität setzt sich aus spezifisch an die Na⁺/K⁺-ATPase sowie unspezifisch gebundenem ³H-Ouabain zusammen. Durch das am Ende der Inkubation zugegebene nichtradioaktive Ouabain kommt es zu einer extremen Verdünnung des ³H-Ouabains. Als Folge davon wird abdissozierendes ³H-Ouabain durch kalten Marker ersetzt und die Radioaktivität der Probe nimmt ab. Da diese Abnahme einer Reaktion 1. Ordnung entspricht, kann nach der Berechnung der Dissoziationskonstanten der Meßfehler zwischen wahrer und gemessener Bindung (•) abgeschätzt werden. Er betrug bei den durchgeführten Versuchen ca. 1,5%.

4.2.4. Methoden zur Bestimmung der unspezifischen Bindung

Ouabain gilt in der Literatur als spezifischer Marker für die Na^+/K^+ -Pumpe (101). Es ist jedoch anzunehmen, daß auch eine Fixierung an andere Membranstrukturen, z.B. an andere Membranproteine oder wegen seines hydrophoben Charakters an die Lipidschicht der Membran selbst, stattfinden kann. Die Messungen der Ouabainbindungsstellen müssen also um die jeweils vorhandene unspezifische Bindung korrigiert werden.

Die in der Literatur und zum Teil auch hier angewandten Verfahren zeigen aber, daß der Aussagewert dieser Methoden sehr begrenzt ist, da sie keine klare Trennung von spezifischer und unspezifischer Bindung ermöglichen. Folgende Verfahren wurden experimentell untersucht:

a) Vorinkubation mit kaltem Ouabain

Der Grundgedanke dieses von MILLS und MACKNIGHT durchgeführten Versuchs (79) besteht darin, die spezifischen Bindungsstellen mit unmarkiertem Ouabain abzusättigen, um danach mit radioaktivem Ouabain die übriggebliebenen unspezifischen Bindungsstellen zu quantifizieren. Zwei Fehler stehen dabei im Vordergrund:

1. Nach der Auswaschung des kalten Ouabains werden durch Dissoziation ein Teil der Bindungsstellen an der Na^+/K^+ -ATPase wieder frei (siehe Abb. 9). ERDMANN und SCHONER zeigten an Enzympräparationen aus Rindernierenmikrosomen, daß nach 90 min Inkubation in ouabainfreier Ringerlösung bei 37°C bereits 50% der spezifischen Bindungsstellen nicht mehr besetzt sind (26). Diese Bindungsstellen stehen dann im Laufe der Inkubation dem radioaktiven Ouabain zur Assoziation zur Verfügung. Schätzungen anhand der in der eigenen Arbeit ermittelten Bindungskonstanten haben ergeben, daß bei Inkubationszeiten von über 90 min der mit heißem Ouabain besetzte Anteil der spezifi-

schen Bindungsstellen über 15% betragen kann. Dies ist eine Größenordnung, die bereits über manchen Literaturangaben zur gesamten gemessenen unspezifischen Bindung liegt (MILLS (79) ca. 2%).

2. Neben den spezifischen Bindungsstellen werden bei der Vorinkubation auch der größere Teil der unspezifischen Bindungsstellen besetzt. Die Abdissoziation des kalten Ouabains erfolgt aufgrund der geringen Affinität schneller als an den spezifischen Bindungsstellen, dennoch steht dem radioaktiven Ouabain während der Inkubation nur ein Teil der unspezifischen Bindungsstellen zur Assoziation zur Verfügung.

Die mit diesem Versuch gemessene radioaktive Bindung stellt eine Summation dieser beiden Effekte dar, die deshalb nur eine äußerst vorsichtige Abschätzung der tatsächlichen unspezifischen Bindung erlaubt. Keinesfalls jedoch darf die so gemessene Bindung einfach von der ermittelten Gesamtbindung subtrahiert werden, wie dies in der Arbeit von MILLS (79) geschah.

b) Aldehydfixation nach KARNOVSKY

Folgende Überlegung lag dieser Methode zugrunde: Durch Fixation mit Glutaraldehyd wird die Na^+/K^+ -ATPase denaturiert und die Bindungsstelle für Ouabain zerstört (29). Ouabain, das nach der Fixation noch gebunden wird, muß also unspezifisch angelagert sein. Da Glutaraldehyd auch andere Membranproteine denaturiert, und damit auch potentielle unspezifische Bindungsstellen, könnte diese Methode nur einen Mindestwert für die unspezifische Bindung des Ouabains liefern.

Die Versuchsergebnisse zeigen zunächst einen sehr raschen Anstieg der Ouabainbindung in den ersten 30 min. Die dabei gebundene Menge an Ouabain entspricht 50 - 90% der parallel dazu an unfixierten IO-Follikeln gemessenen Werte. Im weiteren

Verlauf nimmt die Ouabainbindung nur noch geringfügig zu, deutlich weniger als im Parallelversuch. Nach 120 min liegt die Bindung an fixierten IO-Follikeln zwischen 40% ($C_0=0,89 \mu\text{M}$) und 60% ($C_0 = 0,11 \mu\text{M}$) der an unfixierten IO-Follikeln gemessenen Werte.

Die so registrierten Kurven entsprechen damit nicht den zu erwartenden Charakteristika einer unspezifischen Bindung. Eine mögliche Erklärung dafür besteht in der Tatsache, daß durch Quervernetzung der Membranproteine durch Glutaraldehyd die Fluidität der Zellmembran und damit auch ihre Dichtigkeit beeinträchtigt ist. Der initiale rasche Anstieg der Ouabainbindung ist also möglicherweise durch einen Einstrom in das Zellinnere verursacht.

Die Methode der Glutaraldehydfixation nach KARNOVSKY ist deshalb nicht zur Darstellung der unspezifischen Bindung geeignet.

c) Vorinkubation in Na-freiem Medium

Bei Versuchen von MILLS et al. (79) zeigte sich, daß die Bindung des Ouabains an die Na^+/K^+ -ATPase stark beeinträchtigt wurde, wenn man die Zellen vorher in einem Medium inkubiert hatte, bei dem Natrium durch Cholin ersetzt worden war. Die Erklärung dafür lautete, daß in der Abwesenheit von extrazellulärem Natrium die ATPase zum größten Teil in der inaktiven, dephosphorylierten Form vorliegt, die eine wesentlich geringere Affinität zu Ouabain besitzt als die Phosphoform (45, 2, 76, 103). Die Restbindung wurde als unspezifisch betrachtet.

Diese Erklärung steht in Widerspruch zu anderen Beobachtungen, die in Abwesenheit von extrazellulärem Natrium einen ATPasevermittelten, ungekoppelten Na^+ -Ausstrom (6, 72) und einen K^+/K^+ -Austausch (41, 106) nachweisen konnten. Beide Effekte sind mit einer Phosphorylierung der ATPase verbunden (42, 59) und durch Ouabain hemmbar (41). Trotz der

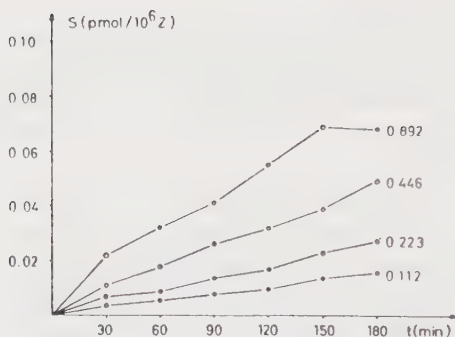


Abbildung 10: Bindung von ^3H -Quabain an IO-Follikel nach Vorinkubation in unmarkiertem Quabain bei Versuchsserie 4. Jeder Punkt entspricht einer Messung. Nach 180 min beträgt die gebundene Quabainmenge etwa 5 - 10% der parallel dazu bestimmten Bindung an nicht vorbehandelte IO-Follikel derselben Präparation.

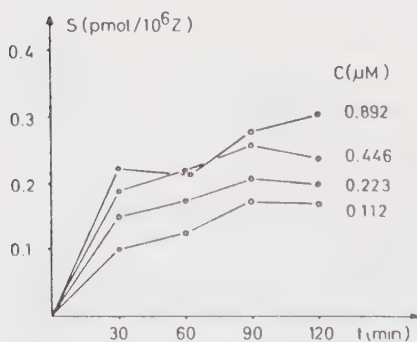


Abbildung 11: Quabainbindung an IO-Follikeln nach Fixation mit KARNOVSKY's Fixans. Aufgrund der Denaturierung der Na^+/K^+ -ATPase sollte sich Quabain nur noch unspezifisch anlagern. Nach 30 min sind bereits 50-90% der Bindung von Serie 4 erreicht (siehe Abb. 8), während danach die Bindung nur noch geringfügig ansteigt. Wahrscheinlich ist dieses Ergebnis auf eine Undichtigkeit der Zellmembran aufgrund der Fixation zurückzuführen.

antagonistischen Wirkung von extrazellulärem Natrium wird bei physiologischen Salzkonzentrationen der K^+/K^+ -Austausch am gesamten K^+ -Einstrom auf 15 - 30% geschätzt (7). Es ist also unwahrscheinlich, daß die Abwesenheit von extrazellulärem Natrium die Ouabainbindungsfähigkeit der Na^+/K^+ -Pumpe stark reduziert.

SILVA et al. (105) konnten in ihren Experimenten keine signifikante Verringerung der Ouabainbindung unter diesen Bedingungen feststellen. Dies deckt sich mit den eigenen Versuchsergebnissen, die keinerlei Unterschied zwischen den 10-Follikeln in Na-freiem und Na-haltigem Medium zeigten, weder in der Affinität zu Ouabain noch in der Anzahl der Bindungsstellen.

Wegen der unzureichenden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von MILLS et al. (79) wurde diese Methode nicht zur Bestimmung der unspezifischen Ouabainbindung herangezogen.

d) Sonstige Verfahren

Zwei weitere Untersuchungsverfahren zur unspezifischen Bindung finden sich in der Literatur:

Das eine Verfahren versucht den antagonistischen Effekt des Kaliums gegenüber Ouabain (39, 101) auszunützen (104). Hohe Kaliumkonzentrationen sollen die Na^+/K^+ -Pumpe für Ouabain blockieren und so die spezifische Bindung ausschalten.

Andere Arbeiten demonstrierten jedoch, daß Kalium zwar die Affinität des Ouabains zur Na^+/K^+ -ATPase reduziert, nicht aber die Bindungskapazität (41). Auch kann extrazelluläres Natrium diesen Effekt zumindest zum Teil wieder aufheben (100, 51). Ferner wurde die antagonistische Wirkung des Kaliums nur bei niedrigen Ouabainkonzentrationen beobachtet (104). Diese komplexen Zusammenhänge lassen eine sinnvolle Anwendung zur Bestimmung der unspezifischen Ouabainbindung sehr zweifelhaft erscheinen.

Im zweiten Verfahren wird nach der Inkubation in radioaktiven Ouabain hochkonzentrierter kalter Marker zugesetzt und die danach noch gebundene Radioaktivität als unspezifisch gewertet (105). Mit dieser Methode wird jedoch nur zwischen reversibler und irreversibler Bindung unterschieden. Das unspezifisch an Membranstrukturen gebundene Ouabain wird ebenso von unmarkiertem Ouabain verdrängt wie das spezifisch gebundene. Lediglich der durch Phagozytose inkorporierte Marker wird mit diesem Verfahren gemessen.

4.3. Die Na^+/K^+ -ATPase

4.3.1. Morphologie

Mit Hilfe cytochemischer und autoradiographischer Verfahren gelang es, einzelne Moleküle der Na^+/K^+ -ATPase an der basolateralen Zellmembran verschiedener Epithelien nachzuweisen (32, 70). Untersuchungen an kristalliner ATPase erlaubten eine Bestimmung der Größe von ca. 12 nm, wobei das Enzym über die zytoplasmatische Membranseite etwa 5 nm und über die extrazelluläre Seite ca. 2 nm hinausragt (117, 83).

In einer Reihe von Arbeiten an gereinigten Enzympräparationen (53, 52, 65, 113, 67) konnten zwei verschiedene Untereinheiten nachgewiesen werden. Die größere α -Untereinheit erstreckt sich durch die ganze Membran (83, 69) und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 100 000 Daltons (85). Alle für die ATPase-Reaktion wichtigen Bindungsstellen befinden sich auf der α -Untereinheit, die Bindungsstellen für Na^+ , Mg^{++} , ATP auf der Innenseite, die für K^+ und Ouabain auf der Außenseite des Enzyms (113, 98, 84, 66).

Die β -Untereinheit, ein Glycoprotein (67), das zum Teil in der Membran verankert ist, mit dem größeren Teil aber ins Zytoplasma ragt (97), ist mit ca. 40000 Daltons wesentlich kleiner. Da bisher keine Bindungsstellen auf der β -Untereinheit nachgewiesen werden konnten, ist ihre Rolle im Pumpenzyklus unklar (97). Die Fixation eines Antikörpers an das β -Protein kann jedoch die Enzymaktivität blockieren (55, 91).

Quervernetzungsexperimente zeigten, daß das Enzym im allgemeinen als $(\alpha\beta)_2$ -Dimer vorliegt (56, 57), wobei auch größere Oligomere vorkommen können (58). In Verbindung mit Arbeiten, die für die funktionelle ATPase-Einheit ein Gewicht von ca. 300 000 Daltons ermittelten (71), wurde das Konzept der "half-of-the-sites-reactivity" aufgestellt, mit der Vorstellung, daß jeweils nur eine der beiden α -Unter-

einheiten eines Dimers phosphoryliert werden könne (108, 90). Jüngere Untersuchungen zeigten jedoch, daß auch das ($\alpha\beta$) Monomer volle Enzymaktivität besitzt (22). Verbesserte Titrationsen der aktiven Bindungsstellen scheinen auch die These des "half-of-the-sites"-Verhaltens in Frage zu stellen (80).

4.3.2. Transportarten

An wiederversiegelten Erythrozytenmembranen konnten vier verschiedene Ionentransportarten nachgewiesen werden:

Der häufigste Modus ist der Transport von intrazellulärem Na^+ nach außen, verbunden mit der Aufnahme von K^+ in die Zelle unter Hydrolyse von ATP. Meist werden dabei drei Na^+ -Ionen und zwei K^+ -Ionen pro Molekül ATP transportiert (115, 38, 10). Die Na^+/K^+ -Pumpe ist also elektrogen. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen kann diese Reaktion auch rückwärts ablaufen, wobei ATP entsteht (24).

Ein zweiter Modus ist der ungekoppelte Na^+ -Ausstrom, wobei unter Hydrolyse von ATP intrazelluläres Na^+ nach außen geschleust wird, falls kein extrazelluläres Na^+ und K^+ vorhanden ist (61, 72).

Daneben ist auch ein Austausch von Na^+ gegen Na^+ möglich. Hierzu wird zwar sowohl ATP als auch ADP benötigt (6, 37). Eine Nettohydrolyse von ATP findet jedoch nicht statt (16). Schätzungen des Anteils eines derartigen Austausches am gesamten Na^+ -Ausstroms bewegen sich zwischen 25 und 30% bei physiologischen Ionenkonzentrationen (7).

Ein vierter Transportmodus ist der K^+/K^+ -Austausch in Abwesenheit von intrazellulärem Na^+ (40, 106). Unter physiologischen Bedingungen kann der Anteil des ausgetauschten K^+ 15 - 30% des gesamten K^+ -Einstroms betragen (7).

4.3.3. Bindungsstellen

Bindungsstellen für ATP:

ATP liegt in vivo wie in vitro gewöhnlich als Mg-ATP-Komplex vor (114) und stellt in dieser Form auch das Substrat für die Na^+/K^+ -ATPase dar (92, 50). Freies ATP wird zwar gebunden, hemmt jedoch die ATPaseaktivität (82). Verschiedene Untersuchungen wiesen je eine Bindungsstelle mit hoher und eine mit niedriger Affinität zu ATP nach (95, 35). Für den normalen Na^+/K^+ -Transport ist die Sättigung der Bindungsstellen mit hoher Affinität ausreichend (96), eine Sättigung der zweiten Bindungsstelle kann jedoch die Aktivität der Pumpe um das zehnfache steigern (95), was eine regulatorische Funktion dieser Bindungsstelle vermuten läßt.

Bindungsstelle für Na^+ :

Mehrere Arbeiten haben gezeigt, daß Na^+ -Bindungsstellen sowohl an der Innen- wie an der Außenseite des Enzyms liegen (3, 36, 97), daneben kann Na^+ auch extrazelluläre K^+ -Bindungsstellen belegen (36). Einige Untersuchungen deuten darauf hin, daß es zwei oder drei intrazelluläre Bindungsstellen für Na^+ mit unterschiedlicher Affinität gibt (34). Nach neueren Studien kann im übrigen auch Lithium die intrazellulären Na^+ -Bindungsstellen aktivieren (8).

Bindungsstelle für K^+ :

Bisher konnten zwei K^+ -Bindungsstellen pro ATPasekomplex mit unterschiedlicher Affinität und positiver Kooperativität nachgewiesen werden (72, 77). Die Bindungsstelle mit hoher Affinität liegt aber offenbar nur nach Phosphorylierung des Enzyms vor (94). Die Bindungsstelle mit geringerer Affinität scheint bei dem K^+/K^+ -Austausch eine Rolle zu spielen (110).

Bindungsstelle für Ouabain:

Ouabain blockiert alle Transportwege der Na^+/K^+ -Pumpe (47) und bindet mit je einem Molekül pro funktioneller Enzymeinheit (56, 71). Aus diesem Grunde wird die Ouabainbindung allgemein als Bezugsgröße für kinetische Studien herangezogen (5). Die Bindungsstelle liegt offensichtlich auf der Extrazellulärseite der α -Untereinheit (33), wobei sich eine optimale Bindungsfähigkeit erst im phosphorylierten Zustand ($\text{E}_2\text{-P}$) des Enzyms ergibt (45). K^+ vermindert die Bindungsgeschwindigkeit (27, 112), ein Effekt, der allerdings durch extrazelluläres Na^+ antagonisiert wird, möglicherweise durch Konkurrenz an den K^+ -Bindungsstellen (100, 9). Ob Ouabain und K^+ um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren (107), ist noch umstritten (97). Die Argumente, daß K^+ daneben auch die Dissoziationsgeschwindigkeit vermindert (1), und die Hemmung der Ouabainbindung durch K^+ nur bei niedrigen Ouabainkonzentrationen beobachtet wurden (104), sprechen eher dagegen. Ferner scheinen auch nichtkompetitive Wechselwirkungen eine Rolle zu spielen (106).

4.3.4. Modell des Bindungsablaufs

Aufbauend auf ihrer Entdeckung, daß die Na^+/K^+ -ATPase nach der Phosphorylierung in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen kann ($\text{E}_1\text{-P}$ und $\text{E}_2\text{-P}$) entwickelten ALBERS und POST (2, 86) ein Modell für die Reaktionsfolge an der Na^+/K^+ -Pumpe, das in modifizierter Form auch heute noch eine wesentliche Arbeitsgrundlage darstellt:

Im ersten Schritt binden Na^+ und Mg-ATP an die intrazelluläre Seite der ATPase, die dabei phosphoryliert wird. Die Reihenfolge der Anlagerung scheint dabei keine Rolle zu spielen (75).

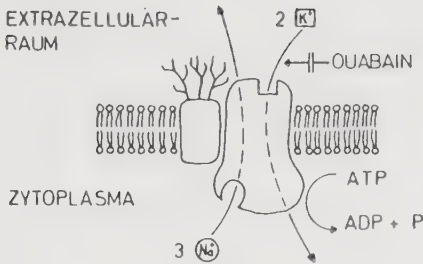


Abbildung 12: Modell der Na⁺/K⁺-ATPase

Die Na⁺/K⁺-ATPase setzt sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammen. Die kleinere Untereinheit ist ein Glycoprotein, dessen Funktion bisher nicht bekannt ist, die größere Untereinheit ist Träger der Bindungsstellen für Na⁺, K⁺, ATP und Ouabain. Unter Phosphorylierung der großen Untereinheiten kommt es zur Anlagerung von 3 Natriumionen an dessen intrazelluläre Seite, die daraufhin durch die Membran geschleust werden. Auf der Extrazellulärseite werden nun 2 Kaliumionen gebunden und nach Dephosphorylierung der ATPase im Zytoplasma freigesetzt. Die Wirkungsweise des Ouabains beruht auf der Blockierung der Dephosphorylierung des Enzyms.

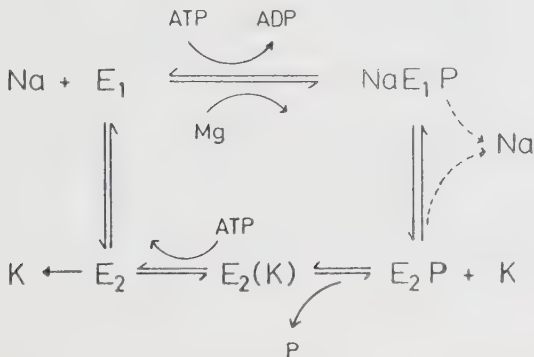


Abbildung 13: Vereinfachtes Reaktionsmodell des Pumpenzyklus der Na⁺/K⁺-ATPase.



Welche Enzymform Na^+ an der Außenseite der Membran wieder abgibt, ist noch unklar. POST et al. (88) schlugen E_1-P vor, während KARLISH et al. (62, 23) die E_2-P Form favorisieren.

Nach Abgabe des Na^+ wird nun K an E_2-P angelagert, wobei der Phosphatrest abgespalten wird (82). Das Schicksal des gebundenen Mg ist noch ungeklärt (110, 93).



Aufgrund der Tatsache, daß die Freisetzung von K^+ bei geringen Substratkonzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit limitieren kann (73, 74), wurde die Hypothese aufgestellt, daß das K^+ in einer okkludierten Form an E_2 gebunden sein muß (60, 63). KARLISH et al. zeigten, daß die Bindung von ATP an der Bindungsstelle niedriger Affinität die Freisetzung des okkludierten K^+ beschleunigt (62). Nach dem Modell von ALBERS und POST wird das K^+ nach der Konformationsänderung des Enzyms von der E_2 -Form in die E_1 -Form freigesetzt.



Da alle Reaktionsschritte reversibel sind, werden unter bestimmten experimentellen Bedingungen die oben erwähnten anderen Transportarten ermöglicht (24).

Verschiedene Ansätze wurden gemacht, die fast ausschließliche Existenz der Na^+/K^+ -ATPase als $(\alpha\beta)_2$ -Dimer- oder Oligomer-zusammen mit der "half-of-the-sites-reactivity" in das Reaktionsmodell einzubeziehen (42, 14, 15). Das Schema von KARLISH (62) löst dieses Problem durch die Annahme, beide α -Untereinheiten würden phasenverschoben im Pumpenzyklus arbeiten. Dies ist vereinbar mit den Beobachtungen, daß zu einem bestimmten Zeitpunkt nur eine Bindungsstelle für ATP pro Dimer vorhanden ist (56), und daß auch ein $(\alpha\beta)$ Monomer noch Enzymaktivität entfalten kann (22).

4.3.5. Transportmechanismus

Für die Beschreibung der Ionenbewegung durch die Zellmembran standen im wesentlichen zwei Modelle zur Verfügung:

- a) ein mobiler Carrier, der durch Rotation oder Wanderung durch die Membran die Ionen befördert (13), wie dies bei einigen passiven Transportsystemen der Fall ist.
- b) ein oszillierender Kanal, der durch Konformationsänderungen die Ionen durch die Membran transportiert (54)

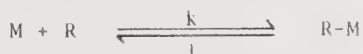
Arbeiten, die demonstrierten, daß die Na^+/K^+ -ATPase auch durch Anlagerung von großen Antikörpern nicht in ihrer Aktivität behindert wird (68), machen erstere Modellvorstellung sehr unwahrscheinlich. Da die β -Untereinheit des Enzyms nicht an einer Kanalbildung beteiligt zu sein scheint (22) und verschiedene Experimente gegen eine Porenbildung zwischen α -Untereinheiten sprechen (21, 81), konzentriert man sich nun auf die Suche nach Poren in der Proteinstruktur einer α -Untereinheit.

CHANDLER et al. (17) schlugen ein Modell vor, in dem drei nebeneinander liegende α -Helices Kanäle für drei Na-Ionen bilden. Bei Kontakt mit Na^+ kommt es zu einer Änderung der Proteinstruktur in eine Helix mit großer Öffnung ($4,4_{10}$ -Helix), die das Na-Ion aufnimmt. Durch eine anschließende Konformationsänderung in eine enge Helix (3_{10} -Helix) wird das Ion auf die andere Seite der Membran geschoben. Dadurch öffnen sich zwischen den drei Helices zwei Poren, die groß genug sind, um je ein K-Ion aufzunehmen. Während des Transports durch die Membran werden die α -Helices der Na-Kanäle wiederhergestellt und ein neuer Pumpzyklus kann beginnen.

Dieses Modell ist physikalisch und energetisch plausibel, und bietet daneben auch eine Erklärung für die $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$ -Stöchiometrie der Pumpe. Inwieweit dieses Modell auch der Wirklichkeit entspricht, wird wohl erst eine Strukturanalyse der ATPase zeigen.

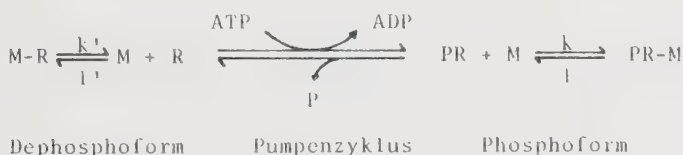
4.4. Diskussion des Bindungsmodells

Fast alle Arbeiten, die sich mit der Kinetik der Ouabainbindung an die Na^+/K^+ -ATPase beschäftigen, stützen sich auf das Modell einer einfachen Marker-Rezeptor-Wechselbeziehung (104, 43, 112, 4).



(M = Marker; R = Rezeptor; R-M = Marker-Rezeptor-Komplex;
k = Assoziationskonstante; 1 = Dissoziationskonstante).

Da die Na^+/K^+ -ATPase aber nicht nur in phosphorylierter, sondern auch in dephosphorylierter Form vorliegen kann (41) und somit keine einheitliche Rezeptorpopulation existiert, muß das obige Modell entsprechend erweitert werden:



(R = Dephosphorylierter Rezeptor; PR = Phosphorylierter Rezeptor; k' , $1'$ = Bindungskonstanten der Dephosphoform).

Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß die Affinität des Phosphoenzyms zu Ouabain wesentlich größer ist, als die der Dephosphoform (66, 79, 97). Das Gleichgewicht der obigen Reaktion liegt also ganz auf der rechten Seite, mit der Folge, daß bei unendlicher Markerkonzentration und Inkubationszeit alle ATPasemoleküle in phosphorylierter Form mit Ouabain besetzt sind. Unter endlichen Bedingungen existiert jedoch immer ein gewisser Prozentsatz an unbesetzter ATPase, die dann in der Dephosphoform Ouabain anlagern kann. Einige Experimente lassen auch vermuten, daß innerhalb eines Pumpenzyklus die Dephosphoform, die die Kaliumionen ins Zellin-

nere transportiert, deutlich länger existiert als die Phosphoform (58, 87, 73), was die Bildung eines M-R-Komplexes ebenfalls begünstigt.

Der wichtigste Unterschied des erweiterten Bindungsmodells zum alten Reaktionsschema besteht in der Anfangsgeschwindigkeit der Bindungsreaktion. Während letzteres von einer einheitlichen Rezeptorpopulation ausgeht, läßt sich die Anfangsgeschwindigkeit nach dem erweiterten Modell in zwei Komponenten zerlegen:

$$v_{(0)} = R \cdot k^* \cdot C \quad \text{altes Modell}$$

$$v_{(0)} = R \cdot k' \cdot C + PR \cdot k \cdot C \quad \text{erweitertes Modell}$$

($v_{(0)}$ = Reaktionsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t = 0$; C = Ouabainkonzentration).

Die Anwendung des ersten Modells auf die Bindung des Ouabains an die Na^+/K^+ -ATPase führt also zur Berechnung einer "funktionellen" Assoziationskonstante k^* , die zwischen k und k' liegt und kein reales Korrelat besitzt. Die meisten Arbeiten konnten in ihrem Datenmaterial keine systematischen Abweichungen von einer einfachen Marker-Rezeptor-Wechselbeziehung feststellen (26, 44, 104). Einige Untersucher fanden aber Anhaltspunkte für das Vorliegen von zwei Bindungsstellen in bestimmten Geweben (105, 44, 111). Ferner ist bekannt, daß bei bestimmten Konzentrationen von Liganden wie Kalium, Phosphat und Magnesium, gekrümmte Scatchard-Plots auftreten, die sich nicht mit der Vorstellung einer einheitlichen Rezeptorpopulation vereinbaren lassen (44). Beide Phänomene könnten mit Hilfe des erweiterten Bindungsmodells als Begünstigung der Dephosphoform der Na^+/K^+ -ATPase verstanden werden. Weiteren Aufschluß darüber wird wahrscheinlich erst eine gründliche Analyse der Bindungskinetik bei einer deutlich verbesserten Meßgenauigkeit liefern.

4.5. Diskussion der Ergebnisse

4.5.1. Durchlässigkeit der tight junctions

Die durch die Invertierung der Schilddrüsenfollikel entstandene Orientierung der apikalen Zellmembran nach außen, machte es zunächst erforderlich zu belegen, daß das eingesetzte Ouabain alle spezifischen Bindungsstellen erreichen kann. Nach autoradiographischen und cytochemischen Untersuchungen an verschiedenen Epithelien (z.B. an Salzdrüsen von Vögeln (30) und Reptilien (25), Kaninchenileum (109), Nierengewebe von Ratte (31) und Hund (70), sowie Fisch- und Froschblasen (78, 89)) ist die Na^+/K^+ -Pumpe zum größten Teil oder sogar ausschließlich an der basolateralen Zellmembran lokalisiert. Ouabain muß also die tight junctions zwischen den Zellen passieren, um vom Lumen der IO-Follikel aus die spezifischen Bindungsstellen zu besetzen. Die bisherigen Erfahrungen mit IO-Follikeln haben jedoch gezeigt, daß die tight junctions der Follikel durchlässig gegenüber fast allen mittleren und größeren Molekülen sind (49).

Der Nachweis, daß Ouabain das Follikellumen dennoch ungehindert erreicht, erfolgte anhand der Sauerstoffmessungen. Die mit durchschnittlich 39% sehr hohe Hemmung des Sauerstoffverbrauchs zeigt, daß ein bedeutender Teil der Na^+/K^+ -ATPase blockiert worden sein muß. Der rasche Eintritt der maximalen Hemmung noch innerhalb der Durchmischungsphase von ca. 10 - 15 sek Dauer macht auch eine stärkere Beeinträchtigung der Diffusion unwahrscheinlich. Eine minimale Verzögerung der Diffusion, die zu einer geringgradigen Abflachung der Bindungskurven führen würde, kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden. Untersuchungen an Follikelsegmenten, die dieses Problem umgangen hätten, erwiesen sich aufgrund der geringeren Stabilität der Segmente als nicht durchführbar (siehe 3.2.).

4.5.2. Ergebnisse der Szintillationsmessung

Die erste Versuchsserie mit offenen Follikelsegmenten belegte die prinzipielle Durchführbarkeit der Szintillationsmessung an Thyreozyten und diente der Einrichtung der Meßanordnung.

Das in der zweiten Serie angestrebte Verfahren, das zur Auswertung erforderliche Raster von Meßpunkten durch mehrere Einzelversuche zu erstellen, erwies sich als ungeeignet. Die zwischen den einzelnen Follikelpräparationen stark schwankenden Meßwerte ließen sich nur schlecht zu einem einheitlichen Kurvenbild zusammenfassen.

Bessere Resultate lieferten die Großversuche der Serie 3 und 4, die die Erstellung einer Kurvenschar aus einer Zellpräparation zuließen. Die nach Streichung offensichtlich falscher Meßpunkte durchgeführten Parameterbestimmungen zeigen ebenfalls Unterschiede zwischen den einzelnen Präparationen (siehe Tab. 5). Die Hauptursachen dafür bestehen in einer unterschiedlich starken Beeinträchtigung der Thyreozyten während des Isolationsvorgangs, der individuellen Schwankungsbreite und eventuell variierender Stimulationszustände der als Ausgangsmaterial dienenden Schweineschilddrüsen.

Die um ca. 20% geringere Bindungsfähigkeit der Thyreozyten in der Serie 4 wurde auf eine aggressivere Collagenasepräparation zurückgeführt, die die morphologische Qualität der Follikel beeinträchtigte und möglicherweise auch die Na^+/K^+ -Pumpe schädigte.

Insgesamt ist die Schwankungsbreite der Resultate für ein komplexes Zellsystem wie den IO-Follikel eher gering. Die Eignung für Studien der Bindungskinetik kann somit als gesichert gelten.

Nicht gelöst wurde das Problem der unspezifischen Bindung. Wie in 4.2.4. ausführlich dargelegt, konnte kein erfolgversprechendes Verfahren zur Quantifizierung der unspezifischen Bindung gefunden werden. Es wurde deshalb darauf verzichtet, die Meßergebnisse entsprechend zu korrigieren. Die Ergebnisse des Verfahrens der Vorinkubation in kaltem Ouabain lassen jedoch den Schluß zu, daß die unspezifische Bindung nur einen relativ geringen Einfluß auf die Gesamtbindung hat.

4.5.3. Bedeutung der Messungen

Die besondere Bedeutung der durchgeführten Experimente liegt in der erstmaligen Verwendung eines Zellsystems, das die Vorteile einer Reinkultur eines Epithels besitzt und gleichzeitig die Zellen in ihrem physiologischen Zellverband beläßt. Daneben bietet die minimale Diffusionsstrecke im IO-Follikel die Möglichkeit, den zeitlichen Verlauf der Ouabainbindung zu untersuchen. Dies ist bei Gewebeschnitten nicht möglich.

Von allen bisher verwendeten in vitro-Systemen zur Untersuchung der Na^+/K^+ -ATPase bietet der IO-Follikel damit die beste Übertragbarkeit auf die physiologischen Verhältnisse im Epithelgewebe. Ein direkter Vergleich mit Resultaten anderer Arbeiten ist daher aufgrund methodischer Unterschiede nur begrenzt möglich.

Die Arbeit stellte einen Versuch dar, Aufschlüsse über Menge und Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase sowie der Ouabainbindungskinetik an IO-Follikeln zu erhalten, und bildet so eine Grundlage für weitere Studien über die Na^+/K^+ -Pumpe an Thyreozyten.

4.5.4. Besprechung der Arbeiten anderer Autoren

a) Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Autoren	Gewebe	System	Temp.	Versuchsbedingungen
LEHNER	Schweine- thyroidea	IO-Follikel	37°C	keine Stimulation
ERDMANN et al. (26) 1973	Rinderniere Rinderherz Rinderhirn Hundeherz Meerschwein- chenniere	Enzympräp.	37°C	Stimulation mit 3 mM $MgCl_2$, 3 mM Trisphosphat
BRADING et al. (11) 1974	Meerschwein- chen taenia coli	Gewebestücke	36°C	60 min Inkubationszeit $K^+ = 0$ mM $K^+ = 0,6$ mM
ERLICH et al. (28) 1976	Frosch M. sartorius	ganzer Muskel	20°C	50 min Inkubationszeit
HAUSEN (44) 1976	Rinderhirn	Enzympräp.	37°C	3 mM Mg^{++} , 0,2 mM P_i 3,0 mM P_i
ERNST et al. (32) 1977	Hausenten	Gewebe- schnitte	37°C	Ringerlösung
SHAWER et al. (104) 1978	Kaninchen- niere	Gewebe- schnitte	25°C	
MILLS et al. (79) 1981	Schweine- niere LLC-Pk ₁	Monolayer	37°C	
CLAUSSEN et al. (19) 1983	Ratten M solcus	ganzer Muskel	30°C	Kaliumfreie Ringerlösung 4 Wo alte Ratten 12 Wo alte Ratten 4 Wo alte Ratten
SILVA et al. (105) 1983	Rectaldrüse Hki	Gewebe- schnitte isolierte Zellen	25°C	Vorstimulation mit Theophyllin unstimuliert stimuliert unstimuliert stimuliert 2 Bindungsstellen

Bindungsstellen	Assoziations-K 1/(min*µM)	Dissoziations-K 1/min	Michaelis-Menten-K Molar
1,02 pmol/10 ⁶ Z	$6,3 \cdot 10^{-2}$	$1,47 \cdot 10^{-3}$	$2,33 \cdot 10^{-8}$
	1,10 2,17 2,78 3,27 1,05	$5,64 \cdot 10^{-3}$ $5,94 \cdot 10^{-3}$ $7,98 \cdot 10^{-3}$ $1,38 \cdot 10^{-2}$ $1,47 \cdot 10^{-7}$	$5,1 \cdot 10^{-9}$ $2,8 \cdot 10^{-9}$ $2,8 \cdot 10^{-9}$ $4,2 \cdot 10^{-9}$ $1,4 \cdot 10^{-7}$
0,18 pmol/mg wet wt			$8,0 \cdot 10^{-8}$
0,20 pmol/mg wet wt			$1,2 \cdot 10^{-7}$
1600 sites/µm			$4,4 \cdot 10^{-7}$
2 Bindungsstellen			$2,8 \cdot 10^{-7}/1,6 \cdot 10^{-8}$ $3,8 \cdot 10^{-8}/1,5 \cdot 10^{-9}$
23 pmol/mg wet wt			
13,5 pmol/mg wet wt 410 sites/Zelle	$2,86 \cdot 10^{-3}$	$1,46 \cdot 10^{-3}$	$5,1 \cdot 10^{-7}$
4,85 pmol/10 ⁶ Z	$3,77 \cdot 10^{-3}$	$1,24 \cdot 10^{-2}$	$5,9 \cdot 10^{-6}$
0,53 pmol/mg wet wt 0,24 pmol/mg wet wt 0,75 pmol/mg wet wt			
			$3,0 \cdot 10^{-6}$ $1,4 \cdot 10^{-6}$ $2,5 \cdot 10^{-7}$ $1,2 \cdot 10^{-7}$ $2,44 \cdot 10^{-7}/5,0 \cdot 10^{-6}$
0,32 pmol/mg wet wt 0,18 pmol/mg wet wt			

b) Diskussion der Ergebnisse

Betrachtet man die an gereinigten Enzympräparationen gemessenen Parameter der Bindungskinetik verschiedener Gewebe, zeigen sie unter gleichen Versuchsbedingungen relativ geringe Abweichungen untereinander (26) (Ausnahme: Meerschweinchen-Niere), was eine weitgehende morphologische Übereinstimmung der Ouabainbindungsstellen nahelegt. Differenzen zwischen den Kinetikparametern verschiedener Epithelien wären dann in erster Linie auf exogene Faktoren zurückzuführen, wie unterschiedliches Substratangebot oder andere Stimulationszustände. Dies unterstreicht die Wichtigkeit von Experimenten an Na^+/K^+ -ATPasen im intakten Zellverband, um Aufschlüsse über die reale Kinetik im Epithelgewebe zu erhalten.

Ein Vergleich mit den an IO-Follikeln bestimmten Werten zeigt, daß die MMK der Enzympräparationen um den Faktor 5 - 10 kleiner ist, das heißt, eine größere Affinität zu Ouabain besteht. Die Assoziationskonstante ist dabei wesentlich größer, während überraschenderweise auch die Dissoziationskonstante erhöht ist, die Dissoziation also rascher erfolgt als an IO-Follikeln. Möglicherweise spielt hier die fehlende Trennung von IZR und EZR und damit die Konfrontation der Enzymaußenseite mit unphysiologischen Ionenkonzentrationen eine Rolle. Kritisch für eine optimale Aktivität der ATPase ist auch die Lipidzusammensetzung der Enzympräparation (20). Die hohe Assoziationskonstante erklärt sich aus der maximalen Stimulation der Na^+/K^+ -ATPase durch den Zusatz von 3 mM Mg^{++} und Phosphat. Die Auswirkungen des Phosphatgehalts zeigt sich sehr deutlich in den Experimenten von HANSEN (14), wo sich die Affinität zu Ouabain bei Reduzierung des Phosphatgehalts auf 0,2 mM um eine Größenordnung verkleinert.

Monolayerkulturen aus Schweinenierenzellen und isolierte Zellen der Rektaldrüse des Haies zeigen eine um den Faktor 50 - 100 schlechtere Affinität zu Ouabain als IO-Follikel.

Hier ist zu berücksichtigen, daß Monolayerzellen durch eine hohe Mitoserate eine andere Stoffwechsellage besitzen, als Zellen mit stark polarer Organisation in der Ruhephase (102). Ähnlich ist es bei isolierten Zellen, die sich nach der Lösung aus dem Zellverband langsam zu unpolaren Zellen umstrukturieren (102). Im Vergleich mit den Verhältnissen in vivo sind Einzelzellen oder Monolayer deshalb 10-Follikeln unterlegen.

Schnitte von Nativgewebe sind für Kinetikstudien nur sehr begrenzt verwendbar. Die hohe Diffusionsstrecke läßt keine Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationskonstante zu. Lediglich die Michaelis-Menten-Konstante kann aus den Sättigungsplateaus berechnet werden. Da die Versuche der Arbeiten (11) und (28) nur über ca. 60 min durchgeführt wurden, und in dieser kurzen Zeit sicher nicht bei allen verwendeten Ouabainkonzentrationen ein Äquilibrium erreicht wurde, müssen diese Werte als methodisch unkorrekt gewertet werden. Die MMK der übrigen Arbeiten liegen ein bis zwei Größenordnungen über der von 10-Follikeln. Da diese Werte bei 25°C bestimmt wurden, und die Reaktion stark temperaturabhängig ist (104), sind die Vergleichsmöglichkeiten stark eingeschränkt.

Bei der Anzahl der Bindungsstellen ist eine direkte Gegenüberstellung aus methodischen Gründen nur mit den Ergebnissen der Monolayerkulturen möglich (79). Diese besitzen eine fünfmal größere Anzahl von ATPasemolekülen pro Zelle, was plausibel erscheint aufgrund der hohen sekretorischen Leistung des Nierenepithels.

In den anderen Arbeiten an Nativgewebe erfolgte der Bezug der gemessenen Radioaktivität auf das Feuchtgewicht des Zellmaterials. Eine überschlagsmäßige Schätzung des Feuchtgewichts von 10-Follikeln anhand des Zellvolumens ergab eine ATPasenzahl von ca. 1 pmol/mg wet wt. Die Angaben der Literatur bei anderen Geweben schwanken zwischen 0,24 pmol/mg wet wt (19) und 23 pmol/mg wet wt (32).

In der Arbeit von ERLIJ und GRINSTEIN (28) erfolgte die Berechnung einer Na^+/K^+ -Pumpendichte von $1600/\mu\text{m}$, was gut dem eigenen Wert von ca. $1200/\mu\text{m}$ entspricht. Wegen der großen Unsicherheit der Abschätzung der Zelloberfläche ist diese Übereinstimmung aber weniger aussagekräftig. Ähnliches gilt für die interessante Methode, die Anzahl der Ouabainbindungsstellen über eine autoradiographische Dichtemessung zu ermitteln. Hier zeigen Nierenepithelzellen von Kaninchen die größte Anzahl mit $4 \cdot 10^6/\text{Zelle}$ (104), andere zitierte Ergebnisse sind $8 \cdot 10^5/\text{Zelle}$ bei Hela-Zellen und $7,5 \cdot 10^5/\text{Zelle}$ bei Meerschweinchen-Nierenzellen. In IO-Follikeln beträgt die Anzahl der ATPasemoleküle $6,1 \cdot 10^5/\text{Zelle}$.

Insgesamt läßt sich sagen, daß die anderen Arbeiten in der Literatur über die Anzahl von Ouabainbindungsstellen an Zellen die Plausibilität der eigenen Resultate stützen. Weiterführende Aussagen, etwa über gewebespezifische Unterschiede lassen sich jedoch aufgrund der großen methodischen Differenzen nicht machen.

Folgende Schlußfolgerungen ergeben sich aus dem Literaturvergleich:

- Das Zellsystem der IO-Follikel ist bei Kinetikanalysen den Enzympräparationen hinsichtlich der Homogenität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unterlegen. Ebenso ist eine Stimulierung der Na^+/K^+ -ATPase nur in begrenztem Umfang möglich.
- Wie Enzympräparationen lassen IO-Follikel eine Auswertung des gesamten Bindungskurvenverlaufs zu und damit neben der MMK auch eine direkte Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationskonstante.
- Im Gegensatz zu Enzympräparationen liegen hier die ATPasemoleküle eingebettet in die Membran lebender Zellen vor mit einer Trennung von intra- und extrazellulärem Milieu, das den physiologischen Verhältnissen weitgehend ent-

spricht. Damit ist es nun möglich, die Einflüsse des natürlichen Umfelds auf die Na^+/K^+ -Pumpe zu untersuchen.

- Der Nachteil von Zellsystemen aus Monolayerkulturen und isolierten Zellen besteht in der mangelnden Differenzierung der Zellen durch das rasche Wachstum bzw. die Ablösung aus dem Zellverband.
- Schnitte von Nativgewebe bieten zwar auch einen stabilen, physiologischen Verhältnissen entsprechenden Zellverband, aber die große Diffusionsstrecke läßt eine genaue Untersuchung der Bindungskinetik nicht zu. Die Durchsetzung des Gewebes mit Fibroblasten, Endothelzellen etc. führt darüberhinaus zu einer Verfälschung der Zahl der Bindungsstellen. Für Stimulationsversuche oder ähnliche vergleichende Experimente scheint die Genauigkeit wohl ausreichend zu sein, so daß die einfachere Handhabung gegenüber 10-Follikeln in diesen Fällen genutzt werden kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die quantitative Bestimmung der Na^+/K^+ -ATPase an Inside-out-Follikel aus Schweineschildrüsen mit Hilfe von radioaktivem Ouabain, sowie eine Untersuchung der Bindungskinetik von Ouabain.

Anhand der Messungen der O_2 -Verbrauchshemmung unter dem Einfluß von Ouabain wurde der Nachweis geführt, daß Ouabain die basolaterale Zellmembran im IO-Follikel ungehindert erreichen kann. In den anschließenden Versuchen wurde die Bindung von ^3H -Ouabain an IO-Follikel im liquid scintillation spectrometer bei verschiedenen Konzentrationen und mehreren Inkubationszeiten registriert. Die Auswertung der Kurvenscharen anhand des Modells einer einfachen Marker-Rezeptor-Wechselbeziehung ergab folgende Bindungskonstanten: Assoziationskonstante $k = 6,3 \cdot 10^{-2} \text{ (min } \mu\text{M)}$, Dissoziationskonstante $l = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ /min}$, Michaelis-Menten-Konstante $= 2,3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ bei einer Gesamtzahl von $6,1 \cdot 10^5$ Bindungsstellen pro Zelle oder $1,2 \text{ pmol}/10^6$ Zellen. Unter Einbeziehung der Ergebnisse der O_2 -Verbrauchsmessungen wurde eine Turnover-rate der Na^+/K^+ -Pumpe von 1100/min ermittelt.

Die Resultate bewegen sich im Rahmen der Beobachtungen an der Na^+/K^+ -ATPase in anderen Zellsystemen. Ein direkter Vergleich ist wegen der großen methodischen Unterschiede jedoch nur eingeschränkt möglich.

Die besonderen Eigenschaften des Zellsystems der IO-Follikel, nämlich das Vorliegen der Thyreozyten in Reinkultur und im physiologischen Zellverband, sowie die hohe Ausdifferenzierung der Zellen ermöglichen eine weit bessere Übertragung der Ergebnisse auf die Verhältnisse in vivo als die bisher zu Studien über die Na^+/K^+ -Pumpe eingesetzten Versuchssysteme, wie Membranpräparationen, Monolayerkulturen oder Gewebeschnitte. Somit liefert diese Arbeit wichtiges Ausgangsmaterial für weitere Studien über die Na^+/K^+ -Pumpe und ihre polare Organisation im Inside-out-Follikel.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AKERA, T., T.M. BRODY, 1971: Membrane adenosine triphosphatase: the effect of potassium on the formation and dissociation of the ouabain-enzyme complex.
J. PHARMACOL. EXP. THER. 176: 545-557
2. ALBERS, R.W., G.J. KOVAL, G.J. SIEGEL, 1968: Studies on the interaction of ouabain and other cardio-active steroids with sodium-potassium activated triphosphatase. MOL. PHARMACOL. 4: 324-336
3. BAKER, P.F., et al. 1969: The ouabain-sensitive fluxes of sodium and potassium in squid giant axons.
J. PHYSIOL. LONDON 200: 459-496
4. BAKER, P.F., J.S. WILLIS, 1970: Potassium ions and the binding of cardiac glycosides to mammalian cells.
NATURE 226: 521-523
5. BAKER, P.F., J.S. WILLIS, 1972: Binding of the cardiac glycoside ouabain to intact cells. J. PHYSIOL. LONDON 224: 441-464
6. BEAUGÉ, L.A., O. ORTIZ, 1973: Na-fluxes in rat red blood cells in K-free solutions. J. MEMBR. BIOL. 13: 165-184
7. BEAUGÉ, L.A., V.L. LEW, 1977: Passive fluxes of sodium and potassium across red cell membranes: In "Membrane Transport in Red Cells" edited by J.C. Ellory and V.L. Lew. LONDON: ACADEMIC 1977: 427-465
8. BEAUGÉ, L., 1978: Activation by lithium ions of the inside sodium sites in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase.
BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA 527: 472-484

9. BODEMANN, H.H., J.F. HOFFMAN, 1976: Side-dependent effects of internal versus external Na^+ and K^+ on ouabain binding to reconstituted human red blood cells ghosts. *J. GEN. PHYSIOL.* 67: 497-525
10. BONTING, S.L., L.L. CARAVAGGIO, 1963: Studies on $\text{Na}^+:\text{K}^+$ activated ATPase. V. Correlation of enzyme activity with cation flux in six tissues. *ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.* 101: 37-46
11. BRADING, A.F., J.H. WIDDICOMBE, 1974: An estimate of sodium/potassium pump activity and the number of pump sites in the smooth muscle of the guinea pig taenia coli using ^3H -ouabain. *J. PHYSIOL.* 238: 235-249
12. BURTON, K., 1956: A study on the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *BIOCHEM. J.* 62: 315-323
13. CALDWELL, P.C., 1969: Energy relationships and the active transport of ions. *CURR. TOP. BIOENERG.* 3: 251-278
14. CANTLEY, L.C., L.G. CANTLEY, L. JOSEPHSON, 1978: A characterisation of vanadate interactions with Na,K -ATPase. *J. BIOL. CHEM.* 253: 7361-7368
15. CANTLEY, L.C., 1981: Structure and mechanism of the Na,K -ATPase. *CURR. TOP. BIOENERG.* 11: 201-307
16. CAVIERES, J.D., I.M. GLYNN, 1979: Sodium-sodium exchange through the sodium pump, the roles of ATP and ADP. *J. PHYSIOL.* 297: 637-645
17. CHANDLER, H.D., C.J. WOOLF, H.R. HEPBURN, 1978: Gliding edge dislocations in protein as a mechanism for active ion transport. *BIOCHEM. J.* 169: 559-565

18. CLARK, L.C., R. WOLF, G. GRANGER, Z. TAYLOR, 1953: Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. J. APPL. PHYSIOL. 6, 189-193
19. CLAUSEN, T., K. KJELDSSEN, A. NORGAARD, 1983: Effects of denervation on sodium, potassium and (³H)ouabain binding in muscles of normal and potassium-depleted rats. J. PHYSIOL. 345: 123-134
20. CORNELIUS, P., J.C. SKOU, 1984: Reconstitution of (Na⁺+K⁺)-ATPase into phospholipid vesicles with full recovery of its specific activity. BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA 772: 357-373
21. CRAIG, W.S., J. KYTE, 1980: Stoichiometry and molecular weight of the minimum asymmetric unit of canine renal sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase. J. BIOL. CHEM. 255: 6262-6269
22. CRAIG, W.S., 1982: Monomer of sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase displays complete enzymatic function. BIOCHEMISTRY 21: 5707-5717
23. DE WEER, P., 1983: Na⁺,K⁺-ATPase: Reaction mechanism and ion translocation steps. CURR. TOP. MEMBR. TRANS. 19: 599-623
24. DE WEER, P., R.F. ROKOWSKI, 1984: Current generated by backward running electrogenic sodium pump in squid giant axons. NATURE 309: 450-452
25. ELLIS, R.A., C.C. GOERTEMILLER, 1974: Cytological effects of salt stress and localisation of transport adenosine triphosphatase in the lateral nasal glands of the desert iguana, *Dipsosaurus dorsalis*. ANAT. REC. 180: 285-298

26. ERDMANN, E., W. SCHONER, 1973: Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ preparations from different tissues and species. Determination of kinetic constants and dissociation constants. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 307: 386-398
27. ERDMANN, E., W. SCHONER, 1973: Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ preparations. II. Effect of cations and nucleotides on rate constants and dissociation constants. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 330, 302-315
28. ERLIJ, D., S. GRINSTEIN, 1976: The number of sodium ion pumping sites in skeletal muscle and its modification by insulin. *J. PHYSIOL.* 259: 13-31
29. ERNST, S.A., CH.W. PHILPOTT, 1969: Preservation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -activated and Mg-activated adenosine triphosphatase activities of avian salt gland and teleost gill with formaldehyd as fixative. *J. HISTOCHEM. CYTOCHEM.* 18: 251-263
30. ERNST, S.A., 1972: Transport adenosine triphosphatase cytochemistry. II. Cytochemical localisation of ouabain-sensitive potassium dependent phosphatase activity in the secretory epithelium of the avian salt gland. *J. HISTOCHEM. CYTOCHEM.* 20: 23-38
31. ERNST, S.A., 1975: Transport ATPase cytochemistry: ultrastructural localisation of potassium-dependent and potassium-independent phosphatase activities in rat kidney cortex. *J. CELL. BIOL.* 66: 586-608
32. ERNST, S.A., J.W. MILLS, 1977: Basolateral plasma membrane localisation of ouabain-sensitive sodium transport sites in the secretory epithelium of the avian salt gland. *J. CELL. BIOL.* 75: 74-94

33. FORBUSH, B., J.F. HOFFMAN, 1979: Evidence that ouabain binds to the same large polypeptide chain of diuretic NA,K-ATPase, that is phosphorylated from P_i . BIOCHEMISTRY 18: 2308-2315
34. FORSTER, D., K. AHMED, 1976: Na^+ dependent phosphorylation of the rat brain ($Na^+ + K^+$)ATPase. Possible non-equivalent activation site for Na^+ . BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 429: 258-273
35. FROEHLICH, J.P., R.W. ALBERS, G.J. KOVAL, R. GOEBEL, M. BERMAN, 1976: Evidence for a new intermediate state in the mechanism of (Na+K)adenosine triphosphatase. J. BIOL. CHEM. 251: 2186-2188
36. GARRAHAN, P.J., I.M. GLYNN, 1977: The sensitivity of the sodium pump to external sodium. J. PHYSIOL. LONDON 192: 175-188
37. GARRAHAN, P.J., I.M. GLYNN, 1967: Factors affecting the relative magnitudes of the sodium:potassium and sodium:sodium exchange catalysed by the sodium pump. J. PHYSIOL. LONDON 192: 189-216
38. GARRAHAN, P.J., I.M. GLYNN, 1967: The stoichiometry of the sodium pump. J. PHYSIOL. LONDON 192: 217-235
39. GLYNN, I.M., 1964: The action of cardiac glycosides on sodium ion movements. PHARMACOL. REV. 16: 381-407
40. GLYNN, I.M., V.L. LEW, U. LOTH, 1970: Reversal of the potassium entry mechanism in red cells, with and without reversal of the entire pump cycle. J. PHYSIOL. LONDON 207: 371-391

41. GLYNN, I.M., S.D.D. KARLISH, 1975: The sodium pump. ANN. REV. PHYSIOL. 37: 13-53
42. GLYNN, I.M., S.J.D. KARLISH, 1976: ATP hypdrolysis associated with an uncoupled sodium flux through the sodium pump: evidence for allosteric effects of intracellular ATP and extracellular sodium. J. PHYSIOL.LONDON 256: 465-496
43. HANSEN, O., 1971: The relationship between g-strophanthin binding capacity and ATPase activity in plasma membrane fragments from brain. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 233: 122-132
44. HANSEN, O., 1976: Non-uniform binding of g-strophantin binding sites of Na^+K^+ activated ATPase. Apparent conversion to uniformity by K^+ . BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 433: 383-392
45. HANSEN, O., 1978: The effect of sodium on inorganic phosphate and p-nitrophenyl-phosphate facilitated ouabain binding to Na^+K^+ -ATPase. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 511: 10-22
46. HANSEN, O., J. JENSEN, J.G. NORBY, P.O. LENGHI, 1979: A new proposal regarding the subunit composition of Na^+K^+ -ATPase. NATURE LONDON 280: 410-412
47. HEGYVARY, C., R.L. POST, 1971: Binding of adenosine triphosphate to sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase. J. BIOL. CHEM. 246: 5234-5240
48. HERZOG, V., H. SIES, F. MILLER, 1976: Exocytosis in secretory cells of rat lacrimal glands. J. CELL. BIOL. 70: 692-706

49. HERZOG, V., F. MILLER, 1981: Structural and functional polarity of inside-out follicles prepared from pig thyroid gland. *EUROP. J. CELL. BIOL.* 24: 74-84
50. HEXUM, T., F.E. SAMSON, R.H. HIMES, 1970: Kinetic studies of membrane $(\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+})\text{ATPase}$. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 212: 322-331
51. HOBBS, A.S., P. B. DUNHAM, 1978: Interaction of external alkali metal ions with the Na-K pump of human erythrocytes. A comparison of their effects on activation of the pump and on the rate of ouabain binding. *J. GEN. PHYSIOL.* 72: 381-402
52. HOKIN, L.E., J.L. DAHL, J.D. DEUPREE, J.F. DIXON, J.F. HACKNEY, J.F. PERDUE, 1973: Studies on the characterisation of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. X. Purification of the enzyme from the rectal gland of *Squalus acanthias*. *J. BIOL. CHEM.* 248: 2593-2605
53. HOKIN, L.E., 1974: Purification and properties of the $\text{Na}^+:\text{K}^+$ activated ATPase and reconstitution of Na^+ -transport. *ANN. N.Y. ACAD. SCI.* 242: 12-23
54. JARDETZKY, O., 1966: Simple allosteric model for membrane pumps. *NATURE* 211: 969-970
55. JEAN, D.H., R.W. ALBERS, G.J. KOVAL, 1975: Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase of electrophorus electric organs. X. Immunochemical properties of the lubrol-solubilized enzyme and its constituent peptides. *J. BIOL. CHEM.* 250: 1035-140
56. JØRGENSEN, P.L., 1974: Purification and characterisation of Na,K-ATPase. IV. Estimation of the purity and of the molecular weight and polypeptide content per enzyme unit in preparations from the outer medulla of rabbit kidney. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 356: 53-67

57. JØRGENSEN, P.L., 1977: Purification and characterisation of Na,K-ATPase VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in presence of NaCl and KCl. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 466: 97-108
58. JØRGENSEN, P.L., 1980: Sodium and potassium ion pump in kidney tubules. *PHYS. REV.* 60 No. 3: 864-917
59. KAPLAN, J.H., L.J. KENNEY, M. WEBB, 1984: P_i phosphorylation of red cell $(Na^+ + K^+)ATPase$ during $K^+ : K^+$ exchange. *BIOPHYS. J.* 45: 159a (Abstract)
60. KAPLAN, J.H., 1985: Ion movements through the sodium pump. *ANN. REV. PHYSIOL.* 47: 535-544
61. KARLISH, S.J.D., I.M. GLYNN, 1974: An uncoupled efflux of Na^+ from human red cells probably associated with Na^+ -dependent ATPase activity. *ANN. N.Y. ACAD. SCI.* 242: 461-470
62. KARLISH, S.J.D., D.W. YATES, I.M. GLYNN, 1978: Conformational transitions between Na^+ -bound and K^+ -bound forms of $(Na^+ + K^+)ATPase$ studied with formycin nucleotides. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 525: 252-264
63. KARLISH, S.J.D., W.D. STEIN, 1982: Protein conformational changes in $(Na^+ , K^+) - ATPase$ and the role of cation occlusion in active transport. *ANN. N.Y. ACAD. SCI.* 402: 226-238
64. KARNOVSKY, J., 1965: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. CELL. BIOL.* 27: 137a (Abstract)

65. KYTE, J., 1971: Purification of the sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase from canine renal medulla. J. BIOL. CHEM. 246: 4157-4165
66. KYTE, J., 1972: The titration of the cardiac glycoside binding site of the ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-adenosine triphosphatase. J. BIOL. CHEM. 247: 7634-7641
67. KYTE, J., 1972: Properties of the two polypeptides of sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase. J. BIOL. CHEM. 247: 7642-7649
68. KYTE, J., 1974: The reaction of Na,K-ATPase with specific antibodies. J. BIOL. CHEM. 249: 3652-3660
69. KYTE, J., 1975: Structural studies of sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase. J. BIOL. CHEM. 250: 7443-7449
70. KYTE, J., 1976: Immunoferritin determination of the distribution of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase over the plasma membranes of renal convoluted tubules. I. distal segments, II. proximal segment. J. CELL. BIOL. 68: 287-318
71. LANE, L.K., J.H. COPENHAVER, G.E. LINDENMAYER, A. SCHWARTZ, 1973: Purification and characterisation of and ^3H -ouabain binding to the transport adenosine triphosphatase from outer medulla of canine kidney. J. BIOL. CHEM. 248: 7197-7200
72. LEW, V.L., M.A. HARDY, J.C. ELLORY, 1973: The uncoupled extrusion of Na^+ through the Na^+ pump. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 323: 251-266

73. MARDH, S., 1975: Bovine brain Na/K-stimulated ATP phosphohydrolase studied by a rapid mixing technique. K^+ -stimulated liberation of ^{32}P -orthophosphate from ^{32}P -phosphoenzyme and resolution of the dephosphorylation into two phases. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 391: 448-463
74. MARDH, S., 1975: Bovine brain Na/K-stimulated ATP phosphohydrolase studied by a rapid mixing technique. Detection of a transient ^{32}P -Phosphoenzyme formed in the presence of potassium ions. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 391: 464-473
75. MARDH, S., R.L. POST, 1977: Phosphorylation from adenosine triphosphate of sodium and potassium activated daenosine triphosphatase. *J. BIOL. CHEM.* 252: 633-638
76. MATSUI, H., A. SCHWARTZ, 1968: Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the($Na^+ + K^+$)dependent ATPase from cardiac tissue. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 151: 655-663
77. MATSUI, M., Y. HAYASHI, H. HOMAREDA, M. KIMIMURA, 1977: Ouabain sensitive ^{42}K binding to Na,K-ATPase purified from canine kidney outer medulla. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* 75: 373-380
78. MILLS, J.W., S.A. ERNST, 1975: Sodium pump sites in frog urinary bladder. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 375: 268-273
79. MILLS, J.W., A.D.C. MACKNIGHT, J.A. JARRELL, J.M. DAYER, D.A. AUSIELLO, 1981: Interaction of ouabain with the Na^+ pump in intact epithelial cells. *J. CELL. BIOL.* 88: 637-643

80. MOCZYDLOWSKI, E.G., P.A.G. FORTES, 1981: Characterisation of 2'3'-O-(2,4,6-trinitrocyclohexadienylidene)adenosine 5'triphosphate as a fluorescent probe of the ATP site of sodium and potassium transport adenosine triphosphatase. *J. BIOL. CHEM.* 256: 2346-2356
81. MOCZYDLOWSKI, E.G., P.A.G. FORTES, 1981: Inhibition of sodium and potassium adenosine triphosphatase by 2'3'-O-(2,4,6-trinitrohexadienylidene)adenosine nucleotides. *J. BIOL. CHEM.* 256: 2357-2366
82. NØRBY, J.G., J. JENSEN, 1971: Binding of ATP to brain microsomal ATPase. Determination of the ATP-binding capacity and the dissociation constant of the enzyme-ATP complex as a function of K^+ concentration. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 233: 104-116
83. O'CONNELL, M.A., 1982: Exclusive labeling of the extra-cytoplasmic surface of sodium ion and potassium ion activated adenosine triphosphatase and a determination of the distribution of surface area across the bilayer. *BIOCHEMISTRY* 21: 5984-5991
84. PERRONE, J.R., R. BLOSTEIN, 1973: Asymmetric interaction of inside-out and right-side-out erythrocyte membrane vesicles with ouabain. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 291: 680-689
85. PETERSON, G.L., E.H. LOWELL, 1981: Molecular weight and stoichiometry of the sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase subunits. *J. BIOL. CHEM.* 256: 3751-3761
86. POST, R.L., S. KUME, T. TOBIN, B. ORCUTT, A.K. SENN, 1969: Flexibility of an active centre in sodium - plus potassium adenosine triphosphatase. *J. GEN. PHYSIOL.* 54: 306s-326a

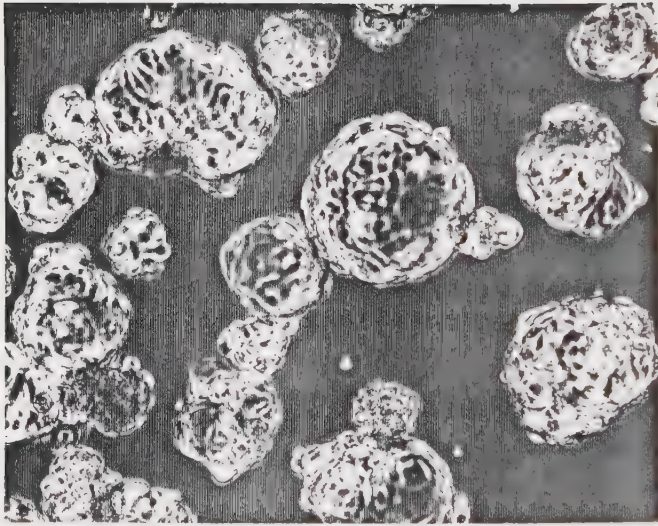
87. POST, R.L., C. HEGYVARY, S. KUME, 1972: Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. J. BIOL. CHEM. 247: 6530-6540
88. POST, R.L., G. TODA, F.N. ROGERS, 1975: Phosphorylation by inorganic phosphate of sodium plus potassium ion transport adenosine triphosphatase. Four reactive states. J. BIOL. CHEM. 250: 691-701
89. RENFRO, J.L., D.S. MILLER, K.J. KARNAKY, W.B. KINTER, 1976: Na,K-ATPase localization in teleost urinary bladder by ^3H -ouabain autoradiography. AM. J. PHYS. 231: 1735-1743
90. REPKE, K.R.H., R. SCHÜN, W. HENKE, W. SCHÜNFELD, B. STRECKENBACH, F. DITTRICH, 1974: Experimental and theoretic examination of the flip-flop model of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ function. ANN. N.Y. ACAD. SCI. 242: 203-219
91. RHEE, H.M., L.E. HOKIN, 1975: Inhibition of the purified Na,K-ATPase from the rectal gland of *Squalus acanthias* by antibody against the glycoprotein subunit. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 63: 1139-1145
92. ROBINSON, J.D., 1974: Nucleotide and divalent cation interactions with $(\text{Na} + \text{K})$ dependent ATPase. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 341: 232-247
93. ROBINSON, J.D., 1974: Affinity of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ dependent ATPase for Na^+ , measured by Na^+ modified enzyme inactivations. FEBS LETT. 38: 325-328
94. ROBINSON, J.D., 1975: Functional distinct classes of K^+ sites on the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ dependent ATPase. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 384: 250-264

95. ROBINSON, J.D., 1976: Substrate sites of the ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) dependent ATPase. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 429: 1006-1019
96. ROBINSON, J.D., 1976: The ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) dependent ATPase mode of inhibition of ADP/ATP exchange activity by MgCl_2 . *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 440: 711-722
97. ROBINSON, J.D., M.S. FLASHNER, 1979: The ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) dependent ATPase. Enzymatic and transport properties. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 549: 145-176
98. RUOHO, A., J. KYTE, 1974: Photoaffinity labelling of the ouabain binding site on Na,K-ATPase. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* 71: 2352-2356
99. SACHS, J.R., 1970: Sodium movements in the human red blood cell. *J. GEN. PHYSIOL.* 56: 322-341
100. SACHS, J.R., 1974: Interaction of external K^+ , Na^+ and cardioactive steroids with the Na/K pump of the human red blood cell. *J. GEN. PHYSIOL.* 63: 123-143
101. SCHWARTZ, A., G.E. LINDENMAYER, J.C. ALLEN, 1975: The sodium-potassium adenosine triphosphatase: Pharmacological, physiological and biochemical aspects. *PHARMACOL. REV.* 27: 3-124
102. SEEFELDER, CH., 1983: Untersuchungen zur Zellproliferation von Schilddrüsenzellen in Monolayerkulturen und Suspensionen von Inside-out-Follikeln. *DISS. MED. FAKULTÄT LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN*
103. SEN, A.K., T. TOBIN, R.L. POST, 1969: A cycle for ouabain inhibition of sodium- and potassium dependent adenosine triphosphatase. *J. BIOL. CHEM.* 244: 6596-6604

104. SHAVER, J.L.F., CH. STIRLING, 1978: Ouabain binding to renal tubules of the rabbit. J. CELL. BIOL. 76: 278-292
105. SILVA, P., J.A. EPSTEIN, A. STEVENS, K. SPOKES, F.H. EPSTEIN, 1983: Ouabain binding in rectal glands of *Squalus acanthias*. J. MEMBRANE BIOL. 75: 105-114
106. SIMONS, T.J.B., 1974: Potassium exchange catalysed by the sodium pump in human red cells. J. PHYSIOL. LONDON, 237: 123-155
107. SKOU, J.C., 1965: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membranes. PHYSIOL. REV. 45: 596-617
108. STEIN, W.D., W.R. LIEB, S.J. KARLISH, Y. EHLAM, 1973: A model for the active transport of sodium and potassium ions as mediated by a tetrameric enzyme. PROC. NAT. ACAD. SCI. USA 70: 275-278
109. STIRLING, C.E., 1972: Radioautographic localization of sodium pump sites in rabbit intestine. J. CELL. BIOL. 53: 701-714
110. SWANN, A.C., R.W. ALBERS, 1978: Sodium and potassium ion-dependent adenosine triphosphatase of mammalian brain. Interaction of magnesium with the phosphatase site. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 523: 215-227
111. TANIGUCHI, K., S. IIDA, 1972: Two apparently different ouabain binding sites of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 288: 98-102
112. TOBIN, T., A.K. SEN, 1970: Stability and ligand sensitivity of ^3H -ouabain binding to $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 198: 120-131

113. UESUGI, S., N.C. DULAK, J.F. DIXON, T.D. HEXUM, J.L. DAHL, J.F. PERDUE, L.E. HOKIN, 1971: Studies on the characterisation of the sodium potassium transport adenosine triphosphatase VI. Large scale practical purification and properties of a lubrol-solubilized bovine brain enzyme. J. BIOL. CHEM: 246: 531-543
114. VELOSO, D., R.W. GUYNN, M. OSKARSSON, R.L. VEECH, 1973: The concentrations of free and bound magnesium in rats tissues. Relative constancy of free Mg^{2+} concentrations. J. BIOL. CHEM. 248: 4811-4819
115. WHITTAM, R., M.E. AGAR, 1965: The connection between active cation transport and metabolism in erythrocytes. BIOCHEM. J. 97: 214-227
116. WOLF, H.U., H.W. PETER, 1972: Kinetics of $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase of human erythrocyte membranes II. Inhibition by ouabain. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 290: 310-320
117. ZAMPIGHI, G., J. KYTE, W. FREYTAG, 1984: Structural organisation of $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase in purified membranes. J. CELL. BIOL. 98: 1851-1864

7. BILDTAFEL



Suspension von Inside-out-Follikeln nach Aussaat und 20stündiger Inkubation in hydrophoben Kulturschalen. Die Follikelsegmente haben sich in dieser Zeit erneut zu Follikeln geschlossen, deren basolaterale Zellmembran aber nun zum Follikellumen hin orientiert ist. Dieses Zellsystem zeigt eine hohe mechanische Stabilität und kann über mehrere Wochen in Kultur gehalten werden (siehe 2.2.2. und Abb. 1).

Die Länge des schwarzen Balkens beträgt 100 μm .

LEBENS LAUF

Am 9. April 1960 wurde ich, Markus Lehner, als zweiter Sohn des Architekten Othmar Lehner und seiner Frau Hildgard Lehner, geb. Hain, in München geboren.

Von 1966 bis 1970 besuchte ich die Grundschule an der Königswieser Straße in München und von 1970 bis 1979 das Ludwigsgymnasium in München, wo ich 1979 das Abitur ablegte.

Im November 1979 begann ich mein Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, das ich im April 1986 mit dem Staatsexamen abschloß.

